

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Hana Procházková

SULFOBUTYLETHER- β -CYKLODEXTRIN JAKO
CHIRÁLNÍ SELEKTOR PRO SEPARACE AMINOKYSELIN
A DIPEPTIDŮ V HPLC

Sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector for
separation of amino acids and dipeptides in HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Gabriela Kučerová

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2017

podpis

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na přípravu nové chirální stacionární fáze (CSF) dynamickým „coatingem“ sulfobutylether- β -cyklodextrinu (SBE- β -CD) na iontově výměnnou stacionární fázi (SF) a otestování separačních schopností, selektivity a stability této CSF. Pro zjištění těchto parametrů byly použity achirální a chirální sady analytů.

Dalším testovaným separačním systémem bylo použití C18 SF s přídavkem SBE- β -CD jako chirálního selektoru (CS) do mobilní fáze (MF).

Sada testovacích chirálních analytů obsahovala aminokyseliny fenylalanin, tyrosin, tryptofan, jejich deriváty a dipeptidy glycyl-DL-tryptofan a glycyl-DL-fenylalanin. Pro studium selektivity pomocí achirálních analytů byly vybrány čtyři sady blokových a neblokových dipeptidů. Dipeptidy ve směsi byly tvořeny stejnými aminokyselinami, avšak s obráceným pořadím. Směs byla tvořena dvěma dipeptidy, např. H-alanylfenylalanin-OH/H-fenylalanylanin-OH.

Pro analýzu byl použit reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) a hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC). Mobilní fáze byly tvořeny: (i) MeOH/deionizovaná voda, (ii) MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10), (iii) MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) a (iv) MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) v různých objemových poměrech.

Připravená SBE- β -CD CSF byla vhodnější pro separaci chirálních látek, kdy byly v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v) nalezeny podmínky pro enantioseparaci sedmi analytů na základní linii a dále čtyři částečné enantioseparace z celkového počtu třinácti testovaných analytů.

Systém tvořený C18 SF s přídavkem SBE- β -CD do MF se ukázal vhodnější pro separace směsí dipeptidů, kdy byly v MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (30/70) (v/v) separovány tři směsi na základní linii a jedna směs byla separována částečně z celkového počtu čtyř testovaných směsí.

Klíčová slova: sulfobutylether- β -cyklodextrin, chirální separace, dipeptidy, aminokyseliny, HPLC

Abstract

The main aim of this work was to prepare and characterize a new chiral stationary phase (CSP). The CSP was prepared by dynamic coating of sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) on a strong anion-exchange stationary phase (SP). The selectivity and stability of the newly prepared CSP were tested on the sets of chiral and achiral analytes.

The next separation system used was composed of C18 SP with the addition of SBE- β -CD as a chiral selector into the mobile phase.

The set of chiral analytes contained amino acids phenylalanin, tyrosine, tryptophan, their derivatives and dipeptides glycine-DL-tryptophan and glycine-DL-phenylalanin. Four groups of mixtures of blocked and unblocked dipeptide isomers were tested for achiral separations. Dipeptides used for the mixtures had the same molecular formula but the sequence of amino acids was reversed.

Measurements were carried out in reversed phase separation mode and hydrophilic interaction liquid chromatography. Mobile phases composed of methanol as an organic modifier and four different aqueous parts: (i) deionized water, (ii) aqueous solution of formic acid (pH 2.10), (iii) 20mM ammonium acetate buffer (pH 4.70) and (iv) 10mM ammonium acetate buffer (pH 8.80) in various volume ratios.

Newly prepared SBE- β -CD CSP was more suitable for separations of chiral analytes. The best mobile phase composition was MeOH/formic acid (pH 2.10) (10/90) (v/v). Out of thirteen chiral analytes, seven were baseline enantioresolved and four partially.

The second tested approach using C18 SP with the addition of SBE- β -CD into the mobile phase was more suitable for the separation of dipeptide mixtures. The best mobile phase composition was MeOH/10mM ammonium acetate buffer (pH 8.80) (30/70) (v/v). Out of four mixtures of dipeptide isomers, three were baseline separated and one partially.

Key words: sulfobutylether- β -cyclodextrin, chiral separation, dipeptides, amino acids, HPLC

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D., za její odborné vedení, vstřícnost, cenné zkušenosti a dohled nad psaním této práce. Nemenší dík patří také Mgr. Gabriele Kučerové za praktické rady, pomoc při vypracovávání experimentální části práce a za neustávající ochotu a trpělivost.

Práce vznikla za finanční podpory projektů GAČR P206/14-19278P, 16-05942S a CEEPUS CIII-RO-0010-10-1516-M-91588.

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část.....	12
2.1	Chiralita	12
2.2	Chirální separace	13
2.2.1	Přímé metody chirální separace	14
2.2.2	Nepřímé metody chirální separace	15
2.3	Cyklodextriny.....	16
2.3.1	Tvorba inkluzního komplexu	18
2.3.2	Parametry ovlivňující separace na CD chirálních stacionárních fázích	20
2.3.3	Cyklodextrinové chirální stacionární fáze.....	21
2.3.4	Deriváty cyklodextrinů.....	22
2.3.5	Nabité cyklodextriny	23
2.3.6	Sulfobutylether- β -cyklodextrin	23
2.3.7	Využití cyklodextrinů.....	25
2.4	Příprava nových CD chirálních stacionárních fází	26
2.5	Aminokyseliny a dipeptidy.....	26
3	Experimentální část.....	27
3.1	Přístroje a pomůcky.....	27
3.2	Chemikálie	28
3.3	Příprava dynamicky „coatované“ stacionární fáze se SBE- β -CD.....	29
3.4	Přídavek SBE- β -CD do mobilní fáze.....	29
3.5	Příprava vzorků	29
3.6	Příprava mobilních fází.....	30
3.7	Podmínky separace	31

3.8	Určení mrtvého času kolon	31
3.9	Výpočty chromatografických parametrů	31
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	Chirální separace	33
4.1.1	Chirální separace na připravené SBE- β -CD stacionární fázi	33
4.1.2	Chirální separace na C18 stacionární fázi s přidavkem SBE- β -CD do mobilní fáze	43
4.1.3	Porovnání separace chirálních látek na připravené SBE- β -CD stacionární fázi a C18 stacionární fázi s přidavkem SBE- β -CD do mobilní fáze	48
4.2	Separace směsí achirálních analytů	49
4.2.1	Separace směsí achirálních analytů na připravené SBE- β -CD stacionární fázi	49
4.2.2	Separace směsí achirálních analytů na C18 stacionární fázi s přidavkem SBE- β -CD do mobilní fáze	56
4.2.3	Porovnání separace směsí achirálních látek na připravené SBE- β -CD stacionární fázi a C18 stacionární fázi s přidavkem SBE- β -CD do mobilní fáze ...	61
5	Závěr	62
6	Použitá literatura	64

Seznam použitých zkratek a symbolů

Zkratka / symbol	Název
α -methyl-DL-Tyr	α -methyl-DL-tyrosin
CD	cyklodextrin
CD-CSF	cyklodextrinová chirální stacionární fáze
CE	kapilární elektroforéza
CS	chirální selektor
CSF	chirální stacionární fáze
DL-4-Cl-Phe	DL-4-Cl-fenylalanin
DL-Phe	DL-fenylalanin
DL-Trp	DL-tryptofan
DL-Tyr	DL-tyrosin
GC	plynová chromatografie
Gly-DL-Phe	glycyl-DL-fenylalanin
Gly-DL-Trp	glycyl-DL-tryptofan
H-Ala-Phe-OH	H-alanylfenylalanin-OH
H-Ala-Tyr-OH	H-alanyltyrosin-OH
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
H-Phe-Ala-OH	H-fenylalanylalanin-OH
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
H-Tyr-Ala-OH	H-tyrosylalanin-OH
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
PTFE	polytetrafluorethylen
RP-HPLC	reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie
SBE- β -CD	sulfobutylether- β -cyklodextrin
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
<i>t</i> -BOC	<i>tert</i> -butyloxykarbonylová blokovací skupina

<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl-4-Cl-DL-fenylalanin
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl-DL-fenylalanin
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl-DL-tryptofan
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl-DL-tyrosin
UV	ultrafialová oblast záření
<i>Z</i>	benzyloxykarbonylová blokovácí skupina
<i>Z</i> -Ala-Phe-OH	benzyloxykarbonyl-alanylphenylalanin-OH
<i>Z</i> -Ala-Tyr-OH	benzyloxykarbonyl-alanyltyrosin-OH
<i>Z</i> -DL-2-F-Phe	benzyloxykarbonyl-DL-2-F-fenylalanin
<i>Z</i> -DL-3-F-Phe	benzyloxykarbonyl-DL-3-F-fenylalanin
<i>Z</i> -Phe-Ala-OH	benzyloxykarbonyl-fenylalanylalanin-OH
<i>Z</i> -Tyr-Ala-OH	benzyloxykarbonyl-tyrosylalanin-OH
α	faktor selektivity
C_M	hmotnostní koncentrace
k_1, k_2	retenční faktor prvního a druhého eluujícího enantiomeru/analytu
pK_A	logaritmický tvar disociační konstanty
<i>R</i>	rozlišení
t_M	mrtvý čas kolony
t_R	retenční čas analytu
t_{R1}, t_{R2}	retenční čas prvního a druhého eluujícího enantiomeru/analytu
w_1, w_2	šířka píku v polovině výšky píku prvního a druhého eluujícího enantiomeru/analytu

1 Úvod

Většina přírodních látek je chirálních a vyskytuje se ve formě enantiomerů. Živé organizmy představují chirální prostředí, kde jsou jednotlivé enantiomery rozlišovány stereoselektivními metabolickými cestami. [1] Stavební bloky našeho těla a všech živých organismů jsou tvořeny biopolymery, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a polysacharidy, které jsou tvořené chirálními monomery. [2] Již v polovině 19. století bylo zjištěno rozdílné chování enantiomerů, avšak většího rozvoje bylo dosaženo až v souvislosti s vývojem efektivních separačních metod. [1]

Syntetické látky užívané v lékařství jsou velmi často chirální, a pokud není léčivo vyráběno stereoselektivní syntézou, jež vede ke vzniku pouze jednoho enantiomeru léčiva, vzniká syntézou racemická směs. [3, 4, 5] Separační metody jsou z finančního hlediska příznivější než metody asymetrické syntézy, proto většina farmaceutických společností připravuje jednotlivé enantiomery léčiv pomocí separačních metod. [6]

Analýza chirálních látek je velmi důležitá oblast aplikace separačních metod, a to obzvláště ve farmacii, jelikož enantiomery dané látky často vykazují rozdílné farmakologické a toxikologické účinky. [7] Zatímco jeden enantiomer vykazuje požadované terapeutické účinky, druhý může mít slabší účinky, může být neaktivní nebo může mít nežádoucí, až toxické účinky. Nejen enantiomery léčivých látek, ale také jejich metabolity a degradační produkty musí být testovány kvůli svým účinkům na organismus. [2, 6, 8] Vlastnosti jednotlivých enantiomerů musí být u chirálních látek testovány ještě dříve, než jsou uvedeny na trh. [9]

Následkem Conterganové aféry z 60. let 19. století došlo k podrobnějšímu sledování účinků jednotlivých enantiomerů. Přípravek Contergan (chemicky thalidomid) byl podáván těhotným ženám proti ranní nevolnosti, ale až později se zjistilo, že *S*-thalidomid vykazuje teratogenní účinky. [1] Farmakologické studie léku pantoprazolu ukázaly, že *S*-(-)-pantoprazol je více účinný než *R*-(+)-pantoprazol a *R,S*-(±)-pantoprazol, a účinněji tak inhibuje produkci žaludečních kyselin, čímž snižuje riziko vzniku gastroenterální ulcerózy. [10] Dalším příkladem může být kyselina askorbová, jejíž *R*-enantiomer je neaktivní. U některých látek můžeme pozorovat racemizaci, tedy jev, kdy jeden enantiomer samovolně přechází v druhý. V takovém případě je snaha

o přípravu jednoho enantiomeru léčiva zbytečná. Tento jev je typický pro chirální diazepam, jako je oxazepam a lorazepam. [1]

Pro získání chirálně čistých látek pomocí separačních metod je zapotřebí vyvinout rychlé a citlivé metody, které se dále využijí ke studiu farmakokinetiky a dalších vlastností jednotlivých enantiomerů. [7, 11]

Chirální separace se kromě farmacie uplatňují také v oblasti potravinářství, v agrochemickém průmyslu, biologii a biotechnologii. [12, 13] Pro vývoj nových metod je nutná detailní znalost dané problematiky. [6]

Analytické separační metody, které jsou dnes nejvíce využívány pro separaci jednotlivých enantiomerů látek, jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE) a superkritická fluidní chromatografie (SFC). [7, 14] V kapalinové chromatografii se výzkum zaměřuje na vývoj nových CSF aplikovatelných pro širokou škálu látek. [4, 12]

Chirálními separacemi se vědci zabývají více než 30 let, přičemž v současné době je k dispozici velké množství CSF, chirálních derivatizačních činidel a CS. Tento výzkum i nadále pokračuje za účelem urychlení analýz a zvýšení efektivity. [15]

2 Teoretická část

2.1 Chiralita

Prostorovým uspořádáním molekul se zabývá rozsáhlý obor stereochemie. Chiralita je slovo odvozené z řeckého *chiros*, což v překladu znamená ruka, dlaň. [13] Za chirální považujeme každý objekt, který není ztotožnitelný se svým zrcadlovým obrazem. [1]

Objev chiralit v roce 1848 je připisován L. Pasteurovi, který se zabýval studiem krystalů vínanu sodno-amonného. [1, 16, 17]

Chiralita molekuly je dána přítomností určitých strukturních částí nazývaných prvky chiralit, jež zahrnují chirální centrum, chirální osu nebo chirální rovinu. [1]

Stereoizomery jsou sloučeniny, které jsou tvořeny stejnými atomy, jež jsou spojené stejným typem vazby. Chirální sloučeniny jsou pak specifickým typem stereoizomerů. Existují v párech, jež jsou navzájem svým zrcadlovým obrazem. Tyto páry označujeme jako enantiomery. [1, 5, 15]

Enantiomery stáčí rovinu lineárně polarizovaného světla procházejícího vzorkem. Enantiomer stáčející rovinu lineárně polarizovaného světla ve směru hodinových ručiček je označován jako (+), zatímco enantiomer stáčející rovinu lineárně polarizovaného světla proti pohybu hodinových ručiček je označován jako (-). Absolutní konfigurace je na chirálních centrech označována jako *R* (*rectus* = pravý) a *S* (*sinister* = levý). [18]

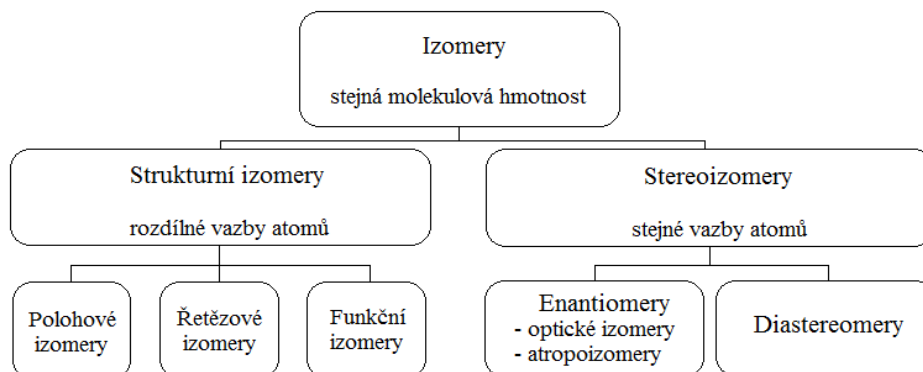
Každá látka, která obsahuje ekvimolární množství enantiomerů, se nazývá racemát. Chiralita je vlastnost celé molekuly, nelze tedy použít pojem chirální skupina apod. [5] Vzájemné vztahy mezi izomerními sloučeninami jsou uvedeny na Obrázku 1.

Diastereomery jsou páry stereoizomerů, které nejsou enantiomery. [15] Jsou to izomery se dvěma centry chiralit, které se liší konfigurací pouze na jednom z nich. [18]

Chirální molekuly obsahují centrum asymetrie, zvané stereogenní centrum. Molekuly s tímto typem stereochemie mohou mít až 2^N stereoizomerů, kde *N* je počet chirálních center. Počet možných stereoizomerů se snižuje, pokud je v molekule přítomna další vnitřní rovina symetrie, ve které je jedna polovina molekuly stejná jako ta druhá. [15]

Nejčastěji je stereogenním centrem atom (například uhlík), na který jsou

navázány čtyři různé substituenty. Existují však i chirální sloučeniny se stereogenními heteroatomy, jako je fosfor, dusík či síra. [15]



Obr. 1. Vzájemné vztahy mezi izomerními sloučeninami. [15, 19]

S rozvojem stereochemických syntéz léčiv se předpokládal ústup ve vývoji metod pro chirální separace, avšak z důvodu racemizace během skladování, zacházení s látkou, či jejím metabolismem v organizmech, je stále zapotřebí jednotlivé formy enantiomerů separovat a analyzovat. [15]

Ve farmaceutickém průmyslu se stalo běžnou praxí zavádění patentů pro konkrétní enantiomer léčivé látky, a to především v případech, kdy se účinky jednotlivých enantiomerů významně liší. [15]

2.2 Chirální separace

Jelikož v achirálním prostředí oba enantiomery vykazují shodné vlastnosti, je většina klasických separačních metod (destilace, extrakce), jež využívají rozdílného bodu varu či rozpustnosti látek, neúčinných. Z tohoto důvodu je možné enantiomery separovat pouze v chirálním prostředí, kde se využívá jejich schopnosti stereospecificky interagovat. [15, 20] Ačkoli byly u mnohých CS pozorovány široké možnosti využití, neexistuje univerzální selektor, jež by se dal použít pro enantioseparaci jakékoli látky. [15, 21]

Chirální HPLC je jedním z nejučinnějších nástrojů dostupných pro analýzu chirálních látek. Existují dva způsoby separace těchto látek: (i) využití přímé metody separace enantiomerů s použitím CSF či přísad CS do MF, nebo (ii) využití nepřímé metody separace zahrnující derivatizaci vzorku. [10]

Stacionární fáze využívané pro enantioseparace mohou být na bázi proteinů, polysacharidů, makrocyclických antibiotik, crown etherů, cykloextrinů (CD), cyklofruktanů, polymerů, výměny ligandů či π -donor-akceptorového typu (tzv. Pirklovy SF). [6, 11, 16]

Kromě těchto komerčně dostupných CSF existuje mnoho typů CS, které dosud nebyly uvedeny na trh. Obecně můžeme CSF rozdělit dle původu na:

- 1) přírodní (CD, makrocyclická antibiotika, proteiny, polysacharidy)
- 2) semi-syntetické (derivatizované CD, deriváty polysacharidů, modifikovaná makrocyclická antibiotika)
- 3) syntetické (chirální polyethery, methakrylátové polymery). [18, 22]

První separace za použití CSF na základě ligandové výměny byla použita pro separaci racemické směsi tvořené prolinem v 60. letech 20. století V. A. Davankovem. [22] Od roku 1981 se začaly objevovat první komerční CSF. [1]

Chirální selektory mají různou strukturu a schopnosti specificky interagovat s enantiomery. Zpravidla obsahují typické strukturní rysy, jako jsou například kavity, ve kterých jsou enantiomery stereospecificky zachytávány. Toto zachytávání je pak stabilizováno slabými interakcemi. [6]

Negativní vliv na enantioseparaci může mít výskyt dalších, nežádoucích interakcí. V některých případech může docházet k nespecifické interakci chirální látky s achirálními částmi CSF (silanolové skupiny, hydrofobní řetězce apod.). [15]

2.2.1 Přímé metody chirální separace

Přímé chromatografické metody využívají CSF nebo přísadu CS jako aditiva do MF. V případě CSF je CS chemicky vázán či adsorbován na povrchu vhodného nosiče/sorbentu. [6, 23] Metody založené na přísadce CS do MF jsou výhodnější z hlediska flexibility, poměrně velkého výběru dostupných CS a nižších finančních

nákladů na pořízení SF v porovnání s komerčními CSF. [10] Tyto metody jsou však limitovány vysokou spotřebou chirálního činidla. [6, 23]

Chirální aditiva jsou CS rozpuštěné v MF, které slouží k vytvoření přechodného diastereomerního komplexu s chirálním analytem. Pro úspěšnou separaci je zapotřebí zvolit optimální koncentraci chirálního aditiva a zároveň musí být dostatečně rozdílná afinita enantiomerů k CS. Chromatografie na achirálních SF s přidavkem CS do MF se využívá zejména v HPLC. Výhodou je možnost snadné detekce analytu v ultrafialové (UV) oblasti, ve které většina chirálních aditiv neabsorbuje záření. [15]

Separační mechanismus přidavku CS do MF je stejný jako v případě využití CSF. Rozdílem je tvorba přechodných diastereomerů, které se v případě přidavku do MF tvoří v mobilní fázi, kdežto v případě CSF se vytváří se SF. [6] Hlavní hnací silou je selektivita a stabilita vznikajícího diastereomerního komplexu. Možnou nevýhodou je nutnost použití vysoké koncentrace CS v MF. [23] Dále to může být omezená rozpustnost a menší stabilita CS v MF, nižší separační účinnost nebo nutnost kontinuálního přidavku často drahého CS. [13]

2.2.2 Nepřímé metody chirální separace

Nepřímou chromatografickou separací je myšlena tvorba diastereomerů následovaná separací v achirálním prostředí. [6, 23]

Chirální látky jsou derivatizovány opticky čistým derivatizačním činidlem za vytvoření páru diastereomerů. Tato derivatizace vyžaduje přítomnost snadno derivatizovatelné funkční skupiny (například amino, hydroxylová, karboxylová či thiolová skupina) v molekule analytu, která je v těsné blízkosti stereogenního centra. Vzniklé diastereomery mají totožnou molární hmotnost, avšak liší se některými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, což vede k jejich jednodušší separaci i za pomoci klasických separačních metod, což u enantiomerů není možné. [15]

Reakce analytu a derivatizačního činidla musí proběhnout úplně a nesmí docházet k následné racemizaci či epimerizaci. Dalším důležitým faktorem je vzdálenost obou chirálních center na vzniklém derivátu. Obecně platí, že vzdálenost by měla být co nejmenší. [13]

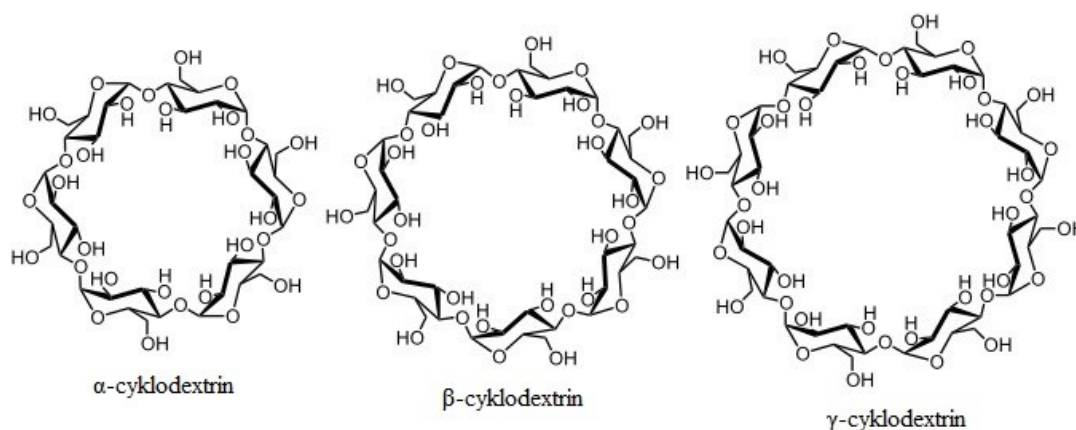
Hlavní výhodou chirální derivatizace je možnost použití nechirálních

chromatografických kolon a dobrá selektivita pro diastereomery. Nevýhodou je nutnost použití opticky čistého derivatizačního činidla (enantiomerní čistota musí být větší než 99,9 %) a možnost racemizace. [18]

2.3 Cyklodextriny

Cyklodextriny jsou cyklické, neredukující oligosacharidy, jež jsou tvořeny D-(+)-glukopyranózovými jednotkami, které jsou spojeny α -1,4-glykosidickou vazbou. [23, 24] Vznikají enzymatickou degradací škrobu pomocí enzymu cyklodextrin-glukosyltransferázy, který je syntetizován mikroorganismy, jako je *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca* a další. [22, 23, 25]

Molekula CD zaujímá tvar dutého kornoutu, tzv. kavitu. [11] Hydrofobní vnitřní část molekuly umožňuje tvorbu stereoselektivních inkluzních „host-guest“ komplexů s mnoha molekulami či ionty, které obsahují hydrofobní části. [24, 26] Nejběžněji užívané jsou α -, β - a γ -CD, které jsou tvořené šesti, sedmi a osmi glukózovými jednotkami. [11] Struktury α -, β - a γ -CD jsou uvedeny na Obrázku 2. S ohledem na cenu, dostupnost a rozměry kavity (vnitřní průměr 7,8 Å pro β -CD [27]) tvoří β -CD 95 % produkce všech CD. Všechny běžně užívané CD jsou průmyslově vyráběny. [23]



Obr. 2. Struktury α -, β - a γ -CD. [28]

Cyklodextriny s menším počtem glukózových jednotek nevznikají kvůli pnutí v kruhu. [27, 29] Cyklodextrin obsahující pět glukózových jednotek se označuje jako pre- α -CD a je možné jej získat pouze syntetickou cestou. [25] Větší počet glukózových jednotek než 8 se téměř nepoužívá kvůli poměrně složité přípravě a čištění. [27, 29]

V CD zaujímají cukerné složky židličkovou konformaci. [23] Makrocyklus CD je stabilizován pásem vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami, kdy se vzrůstajícím počtem jednotek v makrocyklu se vzdálenost těchto skupin zkracuje, a tudíž pevnost vodíkových vazeb roste. Se vzrůstajícím počtem glukózových jednotek vzrůstá i pnutí makrocyklů, které pak není dostatečně kompenzováno vodíkovými vazbami, a dochází k distorzi molekuly. Už molekula δ -CD spíše připomíná elipsu než kružnici. [30]

Každá z glukózových jednotek CD obsahuje pět chirálních center a dvě sekundární hydroxylové skupiny na vstupu do kavity, které zajišťují tvorbu vodíkových vazeb. [27] Molekula β -CD obsahuje 35 stereogenních center. [23]

V CD obsahuje každá glukopyranózová jednotka tři volné hydroxylové skupiny, v molekule β -CD je tedy přítomno 21 volných hydroxylových skupin, ve kterých může být atom vodíku nahrazen celou řadou substituentů, jako je alkyl-, hydroxyalkyl-, amino-, thio-, glykosyl-, maltosyl-, methyl-, hydroxyethyl-, hydroxypropyl-, acetyl- apod. [23] Volné hydroxylové skupiny na okraji kavity CD označujeme jako primární (na uhlíku 6 na užším okraji kavity) a sekundární (na uhlících 2 a 3 na širším okraji kavity). [29]

Polarita CD kavity klesá s klesajícím poloměrem kavity, tedy od γ - k α -CD. [29] Cyklodextriny jsou stabilní jak v bazickém, tak v kyselém prostředí. K hydrolyze dochází při hodnotách pH menších než 2, větších než 11 a teplotě větší než 60 °C. [23, 25, 31]

Cyklodextriny jsou rozpustné ve vodě, přičemž rozpustnost s teplotou roste. β -cyklodextrin má nejmenší rozpustnost ze všech nativních CD. [27] Použití močoviny zvyšuje jeho rozpustnost, ale má za následek problémy se stabilitou základní linie a zvyšuje viskozitu. [23] Močovina se vyznačuje mimořádnou afinitou k molekulám vody, čímž ovlivňuje CD a jejich komplexy prostřednictvím solvatačních efektů. Zvyšuje tak rozpustnost β - a γ -CD ve vodě, zatímco rozpustnost α -CD snižuje. [32]

Cyklodextriny téměř neabsorbují v oblasti UV záření a nejsou citlivé na světlo.

[23, 31] Z tohoto důvodu mohou být pro detekci analytů použity komerčně dostupné UV detektory. Cyklodextriny lze použít pro separaci látek, které mají část molekuly nepolární. [31]

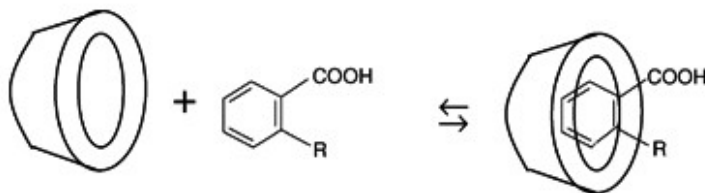
Na mechanismu separace za použití neutrálních CD jako přídavku do MF se podílí:

- 1) rozdíly v konstantě stability CD komplexů vytvořených v MF
- 2) rozdíly v adsorpci CD komplexů na povrchu SF
- 3) rozdíly v interakci samotných enantiomerů daného analytu s vrstvou CD, která je adsorbována z MF na povrch nosiče SF. [33]

2.3.1 Tvorba inkluzního komplexu

Kavita CD umožňuje tvorbu inkluzních komplexů, a to jak s chirálními, tak s achirálními látkami. [20, 34] Vnitřní část kavity je hydrofobní, zatímco vnější část má polární charakter. Hydrofobní kavita umožňuje CD vytvářet tzv. „host-guest“ interakce, zatímco vnější hydrofilní část je přístupná modifikacím, které zajišťují vyšší rozpustnost v požadovaných rozpouštědlech a vyšší separační účinnost. [24, 26, 35] Nejběžnější stechiometrické poměry v komplexech molekula CD:analyt jsou 1:1, 1:2 a 2:1. [27, 32]

Během tvorby inkluzního komplexu vstupuje nepolární část molekuly analytu do kavity CD. [16] Schéma tvorby inkluzního komplexu je znázorněno na Obrázku 3. Analyt musí mít vhodné strukturní vlastnosti, které mu umožní vstoupit do kavity CD nebo alespoň interagovat se skupinami na vnější části kavity. [25]



Obr. 3. Schéma tvorby inkluzního komplexu. [36]

Existuje několik podmínek, které musí molekula analytu splňovat, aby došlo k chirální separaci látky. Molekula nesmí být příliš velká, aby došlo alespoň k částečnému vstupu do kavity CD, chirální centrum analytu by mělo být poblíž vstupu do kavity CD, sloučenina by měla být aromatická a v blízkosti chirálního centra by se měly nacházet atomy umožňující tvorbu vodíkových vazeb. [21, 23] Tvorba komplexu mezi molekulou CD a analytu nastává v případě, kdy je molekula analytu stericky kompatibilní s kavitou CD, přičemž může být zahrnuta pouze část molekuly, a dále pokud je afinita hostující molekuly ke kavitě CD vyšší než afinita dalších přítomných látek. [23]

Vznik inkluzního komplexu probíhá na základě interakcí mezi polární částí hostující molekuly a sekundárními hydroxylovými skupinami na okraji CD kavity. [24] Nabité a hydrofilní skupiny analytu (hydroxylová, karboxylová či aminoskupina) zůstávají mimo kavitu CD i po vzniku komplexu a interagují s povrchovými skupinami CD nebo s molekulami vody či organického rozpouštědla. [32] Rozdíl stability komplexu cyklodextrin-analyt pro každý enantiomer vede k chirální separaci. [37] Vyšší afinita jednoho ze stereoizomerů je výsledkem lepší prostorové orientace analytu v kavitě CD. To vede k prodloužení doby, kterou analyt v kavitě CD stráví a dojde tak k rozdělení jednotlivých forem látky. [31]

Bylo zjištěno, že pokud se CD připraví krystalizací z vody, kavita CD není prázdná, ale naplněná molekulami vody. [27] Tento stav je však energeticky nevýhodný. Během substituce molekul vody analytem dochází ke snížení energie systému, což je pro systém výhodnější. [25, 27]

Inkluzní komplexy mohou být tvořené dvěma a více molekulami. To platí především pro molekulu γ -CD, která disponuje větším poloměrem kavity oproti α - a β -CD. Naopak v případě velké molekuly analytu může být analyt komplexován více molekulami CD. V chirálním rozpoznávání hraje velikost kavity CD velkou roli. [11, 23]

Konkrétním příkladem může být využití tvorby inkluzního komplexu mezi β -CD a valsartanem za účelem zvýšení rozpustnosti. Valsartan je léčivo k terapii hypertenze, které je však nerozpustné ve vodě. Vznikem komplexu se jeho rozpustnost několikanásobně zvýší. [38]

2.3.2 Parametry ovlivňující separace na CD chirálních stacionárních fázích

α -cyklodextriny se nejčastěji aplikují pro separaci malých molekul (systémy s jedním aromatickým kruhem), zatímco β - a γ -CD jsou vhodné pro separace látek o větší relativní molekulové hmotnosti (systémy se dvěma až čtyřmi aromatickými kruhy). [23]

Jakákoliv změna chromatografických podmínek, jako je změna MF, pH, iontové síly, teploty a průtoku MF nebo rozdílná derivatizace CD, má za následek velké rozdíly v hodnotách rozlišení. [6, 39] Nemenší vliv má i samotná konfigurace molekuly analytu. Rozdíly v retencích pozorujeme i u látek, u nichž se liší poloha substituentu - *ortho*, *meta* a *para*. [23, 32] Pokud obsahuje molekula analytu ionizovatelnou skupinu, má na tvorbu inkluzního komplexu vliv i pH a iontová síla MF. V případě, že analyt ionizovatelnou skupinu neobsahuje, tento vliv nebyl pozorován. [23, 39]

Enantioselektivita cyklodextrinových chirálních stacionárních fází (CD-CSF) také úzce souvisí s velikostí analytu. Je-li molekula příliš malá nebo naopak příliš velká vzhledem k velikosti kavity CD, je pravděpodobnost separace této látky nízká. [11, 26] Velikost pórů částic SF má také vliv na separaci. Retence a rozlišení enantiomerů se snižuje se zvyšující se velikostí pórů. [40]

Je obecně známo, že struktura analytu, konkrétně jeho schopnost vstoupit do kavity CD, hraje velmi významnou roli pro separaci. Co je ale velmi často přehlíženo, je možnost tvorby komplexu jednotlivých složek pufru s CD, a tím i možnost ovlivnění retence a separace. Kučerová a kol. potvrdili komplexaci kyseliny benzoové přítomné v MF s nativním CD, která vede ke snížení retence, oproti použití acetátového pufru. [41]

Optimalizace separace enantiomerů na CSF závisí na CS, separačním módu, množství organického modifikátoru v MF, pH mobilní fáze (pro RP-HPLC a HILIC), iontové síle (pro RP-HPLC a HILIC), teplotě, koncentraci aditiva v MF (pufr v případě RP-HPLC, kyseliny, báze nebo jejich soli v polárně-organickém nebo normálním módu), průtoku MF a množství dávkovaného vzorku. [18]

2.3.3 Cyklodextrinové chirální stacionární fáze

Cyklodextrinové chirální stacionární fáze jsou na základě své schopnosti separovat enantiomery mnoha chirálních látek velmi častou volbou pro enantioseparace. [39] Komerčně dostupné CD-CSF se používají pro separaci chirálních látek i směsí achirálních analytů. [14, 41]

Využití nachází v reverzním, normálním, polárně-organickém módu HPLC a v HILIC. [23] Dosažení úspěšné enantioseparace zpravidla klesá v řadě reverzní mód > polárně-organický mód > normální mód. [18] V RP-HPLC přispívá k chirálním separacím především hydrofobní kavita, přičemž v normálním módu k separacím přispívají funkční skupiny na okraji CD kruhu, které interagují s analytem. [4]

Reverzní mód HPLC využívá vodně-organické MF (vodný pufr s obsahem organického modifikátoru, nejčastěji methanolu, acetonitrilu a ethanolu). Organický modifikátor kompetuje s molekulou analytu o kavitu CD, a tím ovlivňuje retenci analytu. Čím větší je množství organického modifikátoru, tím snáze je molekula analytu vytlačena z kavity CD a retence klesá. Organickým modifikátorem s nejnižší eluční silou je methanol, následovaný acetonitrem a ethanolem, které vykazují vyšší afinitu ke kavitě CD. [23]

Podle modelu třibodové interakce platí, že k chirální separaci je zapotřebí působení minimálně tří současných interakcí mezi CS a analytem, přičemž alespoň jedna interakce musí mít stereoselektivní charakter. [1] Tuto teorii jako první odvodil C. E. Dalglish [1], ve 30. letech 20. století ji zavedli E. H. Easson a E. Stedman. [6] Mezi interakce, jež přispívají k chirálním separacím, řadíme vodíkové vazby, Van der Waalsovy interakce, π - π interakce, interakce dipól-dipól, hydrofobní efekt, elektrostatické interakce či sterické bránění. [4, 32] Van der Waalsovy síly, hydrofobní efekt a vodíkové vazby jsou hlavní hnací silnou komplexačního procesu s CD. [25] Hydrofobní efekt je zprostředkován hydrofobní částí molekuly CD, kterou je vnitřní část kavity a představuje hnací sílu pro oddělení nepolární části molekuly od molekul vody. Význam příspěvku vodíkových vazeb k tvorbě inkluzních komplexů souvisí s velkým počtem kyslíkových atomů, které se uplatňují jako Lewisovy báze a velkým počtem vodíkových atomů hydroxylových skupin, které se uplatňují jako Lewisovy kyseliny. Vodíkové vazby zpravidla stabilizují vznikající komplexy. Stabilita vodíkových vazeb v inkluzních komplexech s rostoucí teplotou klesá. [32]

Zvýšení iontové síly zpravidla zeslabuje interakce dipól-dipól a zesiluje hydrofobní efekt v inkluzních komplexech. Opačný účinek na hydrofobní efekt mají organická rozpouštědla. Je však třeba poznamenat, že u látek aromatického charakteru může organické rozpouštědlo efekt naopak podpořit prostřednictvím vodíkových vazeb. [32]

2.3.4 Deriváty cyklodextrinů

Za účelem získání CS, které mají požadované vlastnosti, jsou molekuly CD derivatizovány hydrofobními (např. methyl, propyl) a hydrofilními (sulfoskupina, fosfátová skupina, kvartérní amin apod.) skupinami. [42]

Cyklodextriny a jejich deriváty se staly velmi oblíbenými CS obzvláště v oblasti CE, a to především na základě své schopnosti tvořit inkluzní komplexy s širokou škálou látek a také z důvodu poměrně rozšířené komerční dostupnosti. [37, 43] Mnoho prací se zabývá β -CD SF, ale mnohem větších separačních vlastností dosahují SF obsahující derivatizovaný β -CD. [44 - 48] K derivatizaci dochází na volných hydroxylových skupinách, jež se nachází na vnějším okraji CD kavity a jsou tudíž přístupné pro modifikace. [14, 29]

Cyklodextriny jsou modifikovány z mnoha důvodů, a to především za účelem získání specifických chemických a fyzikálních vlastností – kvůli zvýšení rozpustnosti, zlepšení komplexačních vlastností či kvůli snazšímu uchycení na různé typy povrchů SF. [23, 25, 38, 49]

Hlavním problémem přípravy derivátů CD je různorodost a nejednotnost produktů, nízké výtěžky a nízká selektivita derivatizačních reakcí kvůli velkému množství hydroxylových skupin v molekule CD. Selektivity substituce může být dosaženo využitím rozdílné reaktivity primárních a sekundárních hydroxylových skupin. [49]

Jelikož je rozpustnost nativního β -CD ve vodě poměrně nízká a zároveň je relativně nízká i enantioselektivita, neustále se vyvíjí nové neutrální, kladně i záporně nabitě deriváty CD, které redukují tyto nevýhodné vlastnosti. [50]

Užívanými deriváty jsou například hydroxypropyl- β -CD a hydroxyethyl- β -CD, které vykazují vyšší enantioselektivitu oproti nativnímu β -CD, a to jak v HPLC, tak

i CE. [24] Hydroxypropylether- β -CD byl první derivát CD použitý pro přípravu CSF. [26] Velký zájem roste o vývoj selektivně modifikovaných CD, například Popr a kol. se zabývají syntézou monosubstituovaných tetraalkylamoniových derivátů. [35, 49]

K modifikacím CD dochází nejčastěji v pozici C6. [35] Derivatizací hydroxylových skupin na okraji kavity CD je možné ovlivňovat jejich sterické parametry. Větší sterické bránění je pozorováno v případě derivatizace sekundárních hydroxylových skupin. [32]

2.3.5 Nabité cyklodextriny

Dříve velmi rozšířené nenabitě β -CD jsou nahrazovány univerzálnějšími kladně a záporně nabitými CD. [51]

Nabitě CD, využívané především jako CS v CE, nabízí mnohé výhody oproti běžně užívaným nenabitým derivátům. [14, 37, 43] Nabité CD mohou vytvářet elektrostatické interakce s opačně nabitou molekulou analytu, čímž pomáhají stabilizovat vznikající komplex. [35, 37]

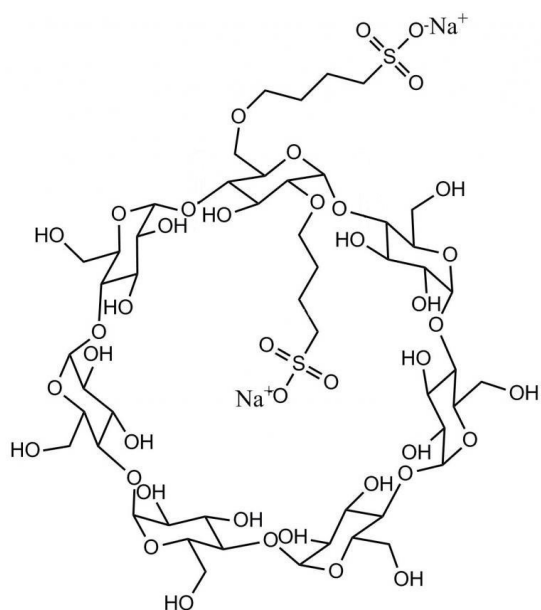
Jelikož se složení náhodně substituovaných CD může lišit, a to především v počtu a pozici nabitých funkčních skupin, může tato variabilita vést k odlišným separačním vlastnostem. [43]

Struktura iontové skupiny, sterické bránění a sebemenší modifikace CD kavity má významný vliv na stabilitu vznikajícího komplexu, a tím i na selektivitu SF. [35]

2.3.6 Sulfobutylether- β -cyklodextrin

Záporně nabitý SBE- β -CD byl charakterizován již v roce 1992 [52] a od té doby se používá v CE a jako přídavek do MF v HPLC, přičemž oproti nativnímu analogu poskytuje v kratších časech větší hodnoty rozlišení. [7, 10, 24, 53]

Captisol[®] je obchodní název heptasubstituovaného SBE- β -CD, který se v porovnání s jeho mono- a tetrasubstituovanými deriváty jeví jako nejvhodnější pro transport látek a tvorbu komplexů. [54] Struktura SBE- β -CD je uvedena na Obrázku 4.



Obr. 4. Struktura SBE- β -CD. [55]

Sulfobutylether může být jako substituent navázán na molekulu CD v pozicích 2, 3 a 6 na jedné nebo více glukopyranózových jednotkách. Při tvorbě komplexu s léčivou látkou dochází ke zvýšení rozpustnosti léčiva a zlepšení prostupnosti látky na cílové místo v organismu. [50, 54] SBE- β -CD je schopen komplexovat malé i velké molekuly, neutrální, kladně i záporně nabitě látky. [54] Používá se například jako nosič pro transport dopaminu do mozku při terapii Parkinsonovy choroby. [56] SBE- β -CD se také může používat pro transport léčiv u pacientů s poruchou funkce ledvin, jelikož je eliminován filtrací a nedochází tak ke kumulaci nosiče v organismu. [57]

Captisol[®] je patentem chráněná směs chemicky modifikovaných CD se strukturou navrženou pro optimalizaci rozpustnosti a stability. V současné době existuje více než 50 klinických preparátů, které využívají Captisol[®], například VFEND[®] IV, KYPROLIS[®] a NOXAFIL IV. [54]

Klasické podání léčiv, která jsou nerozpustná ve vodě či nestabilní, zahrnuje kombinaci organických rozpouštědel, surfaktantů a extrémních podmínek pH. Velmi často je tato léčba pro pacienty nepříjemná a způsobuje mnoho vedlejších účinků. Captisol[®] poskytuje ochranné prostředí pro molekulu léčiva ve své lipofilní kavitě, zatímco hydrofilní povrch zajišťuje dobrou rozpustnost ve vodě. [33, 54]

Hlavní výhodou SBE- β -CD je jeho polyanionická struktura, která může být využita pro přípravu CSF pomocí dynamického „coatingu“, kdy je očekávána tvorba interakcí mezi negativně nabitým SBE- β -CD a kladně nabitým povrchem SF. [7, 50]

Příkladem využití SBE- β -CD jako CS je práce zabývající se separací enantiomerů amlodipinu v RP-HPLC. SBE- β -CD byl použit jako přídavek do MF. [33] Další studie se zabývala využitím SBE- β -CD pro separaci imidazolových derivátů. Pomocí CE byl studován vliv nativních a derivatizovaných CD na separaci, přičemž SBE- β -CD se ukázal jako nejvhodnější CS z testovaných CD. [58]

2.3.7 Využití cyklodextrinů

Cyklodextriny se využívají především z důvodu schopnosti tvořit inkluzní komplexy s anorganickými i organickými látkami, iontovými sloučeninami a také polymery. [27, 59] Hostující molekulou mohou být pevné, kapalné i plynné látky. [25] Široké uplatnění mají v průmyslu, přičemž jejich produkce dosahuje tisíců tun ročně. Výhodou je výroba z obnovitelného zdroje - škrobu, navíc nevykazují žádnou toxicitu a jsou biologicky degradabilní. [30] V potravinářském průmyslu se CD používají jako aditiva. β -cyklodextriny se dle klasifikace Evropské unie označují zkratkou „E 459“. [25]

Cyklodextriny nachází uplatnění v simulaci některých bioprocésů, používají se jako katalyzátory v organické syntéze, jako součást léčiv ke zvýšení biologické dostupnosti, v potravinářských výrobcích ke stabilizaci chuťových a vonných přísad, v kosmetických a pesticidních přípravcích a v barvířství a lakýrnictví ke stabilizaci barevných pigmentů. [30, 32] V rámci ochrany životního prostředí se využívá jejich schopnosti tvořit komplexy s aromatickými látkami, především polycyklickými aromatickými uhlovodíky, které jsou pro životní prostředí nebezpečnými atmosférickými polutanty s mutagenními a karcinogenními účinky. [27]

2.4 Příprava nových CD chirálních stacionárních fází

Nejběžnějším typem stacionární fáze je chemicky vázaná SF, kdy je CS navázán na povrch pevného nosiče (nejčastěji silikagel) pomocí kovalentní vazby. [14] Výzkum se zaměřuje na vývoj nových funkčních derivátů CD, které jsou imobilizovány pomocí různých „linkerů“ (spojek). Pro imobilizaci CD a jejich derivátů se běžně využívají etherové „linkery“. Ty byly poprvé vyvinuty v roce 1985 D. W. Armstrongem. [34]

Dynamický „coating“ je další způsob přípravy SF, kdy je selektor rozpuštěn ve vhodném médiu, jež je následně přiváděno na vhodnou SF (např. iontoměnič) a v důsledku vytvoření vhodných interakcí dojde k navázání selektoru na povrch SF. [14] Tímto způsobem mohou vzniknout nové SF stabilní několik měsíců. Výhodou je také možnost výměny selektoru za jiný pomocí vymývacího procesu a následného „coatingu“ novým selektorem. [60]

Ačkoli je tvorba chemických vazeb považována za lepší postup přípravy CSF z důvodu vytvoření silné a více stabilní kovalentní vazby, dynamický „coating“ poskytuje jednodušší a efektivnější proces. [34]

2.5 Aminokyseliny a dipeptidy

Aminokyseliny a peptidy jsou chemické sloučeniny, které hrají významnou roli v metabolických procesech a ve výživě organismu. Blokované aminokyseliny mohou být použity jako prekurzory během syntézy peptidů, kdy přítomnost blokovací skupiny slouží jako ochrana aminoskupiny či karboxylové skupiny aminokyselin. [50]

Všechny kódované aminokyseliny s výjimkou glycinu obsahují alespoň jedno chirální centrum. Aminokyseliny přirozeně se vyskytující v proteinech jsou přítomny v L-formě, zatímco přítomnost D-formy může rapidně ovlivnit vlastnosti peptidů v živých soustavách. [16]

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a pomůcky

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf

HPLC Agilent Technologies, Waldbroon, Německo

Pumpa Agilent Technologies 1200 series

Odplyňovač mobilní fáze, automatický dávkovač Agilent Technologies 1260 Infinity

Termostat na vzorky, kolonový termostat Agilent Technologies 1290 Infinity

Detektor diodového pole Agilent Technologies 1260 Infinity, Waldbroon, Německo

Software OpenLab[®], Agilent Technologies, Waldbroon, Německo

Chromatografické kolony

Spherisorb[®], SAX 80Å, rozměry 15 cm × 4,6 mm, velikost částic 5 µm, Waters, Milford, MA, USA

Xterra[™] MS C18, rozměry 15 cm × 4,6 mm, velikost částic 5 µm, Waters, Milford, MA, USA

Další pomůcky

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30, ELMA, Německo

Váhy Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko

pH metr PHM 240, Radiometr Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie

0,2 µm a 0,45 µm Minisart syringe filtr, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Německo

Počítačový program ACD/ChemSketch, verze 12.01

Počítačový program Origin, verze 8.1

Počítačový program PeakMaster, verze 5.1

3.2 Chemikálie

Deionizovaná voda, úprava pomocí zařízení Ultrapur a Rowapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací, Watrex[®], Praha, Česká republika

Methanol, Chromasolv[®], gradient grade, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Kyselina octová, ReagentPlus[®], $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Octan amonný, $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Hydroxid amonný, ACS reagent, 28,0 - 30,0%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Kyselina mravenčí, Reagent Grade, $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Sulfobutylether- β -cyklodextrin, Captisol[®], Ligand Pharmaceuticals Inc., La Jolla, CA, USA.

Chirální standardy:

Tert-butyloxykarbonyl-DL-fenylalanin (*t*-BOC-DL-Phe), glycyl-DL-fenylalanin (Gly-DL-Phe), glycyl-DL-tryptofan (Gly-DL-Trp) byly zakoupeny od firmy Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Německo.

Tert-butyloxykarbonyl-DL-tryptofan (*t*-BOC-DL-Trp), *tert-butyloxykarbonyl*-DL-tyrosin (*t*-BOC-DL-Tyr), *tert-butyloxykarbonyl*-4-Cl-DL-fenylalanin (*t*-BOC-4-Cl-DL-Phe), DL-fenylalanin (DL-Phe), DL-tryptofan (DL-Trp), DL-tyrosin (DL-Tyr) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo.

Chirální analyty:

α -methyl-DL-tyrosin (α -methyl-DL-Tyr), DL-4-Cl-fenylalanin (DL-4-Cl-Phe), *benzyloxykarbonyl*-DL-2-F-fenylalanin (Z-DL-2-F-Phe), *benzyloxykarbonyl*-DL-3-F-fenylalanin (Z-DL-3-F-Phe) byly syntetizovány v: Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofie, Bulharsko.

Standardy pro achirální separace:

H-alanyltyrosin-OH (H-Ala-Tyr-OH), H-tyrosylalanin-OH (H-Tyr-Ala-OH), H-fenylalanylalanin-OH (H-Phe-Ala-OH), H-alanylfenylalanin-OH (H-Ala-Phe-OH), *benzyloxykarbonyl*-tyrosylalanin-OH (Z-Tyr-Ala-OH), *benzyloxykarbonyl*-alanyltyrosin-OH (Z-Ala-Tyr-OH), *benzyloxykarbonyl*-fenylalanylalanin-OH (Z-Phe-Ala-OH), *benzyloxykarbonyl*-alanylfenylalanin-OH (Z-Ala-Phe-OH) byly zakoupeny od firmy BACHEM AG, Bubendorf, Švýcarsko.

Struktury analyzovaných látek jsou uvedeny v příloze A.

3.3 Příprava dynamicky „coatované“ stacionární fáze se SBE- β -CD

K přípravě SF pokryté SBE- β -CD byla použita iontově výměnná kolona Spherisorb® SAX 80Å obsahující kvartérní amin jako iontoměnič. Navážené množství SBE- β -CD bylo rozpuštěno v MF MeOH/deionizovaná voda (40/60) (v/v), $C_M = 1 \text{ mg ml}^{-1}$. Vzniklý roztok byl poté přiváděn na kolonu průtokem $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ po dobu 2 hod. Tímto způsobem byla připravena „coatovaná“ SF.

Gravimetrickou analýzou bylo zjištěno, že v průběhu „coatingu“ se na povrchu SF zachytilo množství 0,034 g SBE- β -CD. K zajištění stability separačního systému bylo do MF přidáváno malé množství SBE- β -CD ($C_M = 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$), a to v průběhu celého měření na připravené SF.

3.4 Přídavek SBE- β -CD do mobilní fáze

Při měření na achirální C18 SF byl použit separační systém s přídavkem SBE- β -CD do MF. Pro optimalizaci množství CS přidávaného do MF byly testovány koncentrace $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ a $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ SBE- β -CD, přičemž CS byl rozpuštěn ve vodné části MF.

Z důvodu malých rozdílů chromatografických parametrů (rozlišení R a faktoru selektivity α) proměřených zkušebních vzorků a nižší spotřeby SBE- β -CD byla pro další měření vybrána koncentrace CS $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$.

3.5 Příprava vzorků

Vzorky o koncentraci 1 mg ml^{-1} byly připraveny z pevných standardů navážením 1 mg standardu a rozpuštěním v 1 ml MeOH. Takto připravené vzorky byly poté 5x zředěny MeOH. Vzorky jednotlivých enantiomerů *t*-BOC-Tyr, *t*-BOC-Trp a *t*-BOC-4-Cl-Phe byly poté smíseny v objemovém poměru 1:1. Vzorky dipeptidů byly připraveny smísením jednotlivých forem v objemovém poměru 1:1, např. H-Ala-Tyr-OH a H-Tyr-

Ala-OH.

Vzorky nerozpustné v čistém MeOH byly rozpuštěny ve směsi MeOH/H₂O (v/v) v různých objemových poměrech. DL-tyrosin a α -methyl-DL-tyrosin byly rozpuštěny ve směsi MeOH/H₂O (20/80) (v/v), glycyl-DL-fenylalanin rozpuštěný v MeOH byl zředěn H₂O v poměru 1:1 (vzorek:H₂O) a glycyl-DL-tryptofan rozpuštěný v MeOH byl zředěn H₂O v poměru 1:2 (vzorek:H₂O).

Následně byly vzorky přefiltrovány přes 0,2 μ m polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr.

3.6 Příprava mobilních fází

Pro přípravu 1 l roztoku kyseliny mravenčí o pH = 2,10 bylo do odměrné baňky pipetováno 14,50 ml kyseliny mravenčí a doplněno deionizovanou vodou na požadovaný objem.

K přípravě 1 l 20mM octanu amonného, pH = 4,70, bylo naváženo 1,5724 g octanu amonného, jež byl rozpuštěn v deionizované vodě. Požadovaného pH bylo dosaženo přidáním vypočítaného množství (1,156 ml) kyseliny octové. Poté byl pufr doplněn deionizovanou vodou do výsledného objemu 1 l a přefiltrován přes 0,45 μ m PTFE filtr.

K přípravě 1 l 10mM octanu amonného, pH = 8,80, bylo naváženo 0,7786 g octanu amonného, jež byl rozpuštěn v deionizované vodě. Požadovaného pH bylo dosaženo přidáním vypočítaného množství (413 μ l) hydroxidu amonného. Poté byl pufr doplněn deionizovanou vodou do výsledného objemu 1 l a přefiltrován přes 0,45 μ m PTFE filtr.

K výpočtu koncentrací jednotlivých složek pufrů byl použit program PeakMaster. [61]

Jako organický modifikátor byl použit methanol. Měření byla provedena v MF MeOH/vodná složka od poměru (90/10) (v/v) do (10/90) (v/v) v případě připravené SBE- β -CD stacionární fáze a v MF MeOH/vodná složka od poměru (40/60) (v/v) do (10/90) (v/v) na C18 stacionární fázi s přídavkem SBE- β -CD do mobilní fáze.

3.7 Podmínky separace

Separace vybraných aminokyselin, jejich derivátů, dipeptidů a směsí dipeptidů byly prováděny v RP-HPLC a v HILIC. Dávkovaný objem vzorků byl 5 - 20 μl v závislosti na velikosti odezvy detektoru. Pro detekci byla použita vlnová délka 260 nm. Průtok mobilní fáze byl 1 ml min^{-1} . V průběhu měření byla kolona termostatována na 25 °C, vzorky na 20 °C. Tlak se v chromatografickém systému měnil v závislosti na složení MF. Analýza každého vzorku byla provedena třikrát.

3.8 Určení mrtvého času kolon

Mrtvý čas kolon byl určen nadávkováním methanolu, tj. z rozpouštědlového píku. Pro modifikovanou kolonu Spherisorb[®], SAX 80Å (SBE- β -CD chirální stacionární fáze) byl zjištěn mrtvý čas 1,9 min, pro komerční kolonu Xterra[™] MS C18 1,6 min.

3.9 Výpočty chromatografických parametrů

Chromatografické parametry popisující separaci látek, které jsou použity v kapitole Výsledky a diskuze, jsou: retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R). Tyto parametry byly vypočteny dle rovnic uvedených dále.

Retenční faktor k byl vypočítán dle Rovnice 1:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad , \quad (1)$$

kde t_R představuje retenční čas analytu a t_M mrtvý čas kolony.

Faktor selektivity α byl vypočítán dle Rovnice 2:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad , \quad (2)$$

kde k_1 a k_2 představují retenční faktory prvního a druhého eluujícího enantiomeru/analytu.

Rozlišení dvou sousedních píků R bylo vypočítáno softwarem OpenLab® dle Rovnice 3:

$$R = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}, \quad (3)$$

kde t_{R1} a t_{R2} představují retenční časy prvního a druhého eluujícího enantiomeru/analytu a w_1 a w_2 představují šířky píků v polovině výšky píku prvního a druhého eluujícího enantiomeru/analytu.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Chirální separace

Pro studium enantioselektivity SBE- β -CD SF byly vybrány aminokyseliny fenylalanin, tyrosin, tryptofan, jejich deriváty a dipeptidy glycyl-DL-tryptofan a glycyl-DL-fenylalanin.

4.1.1 Chirální separace na připravené SBE- β -CD stacionární fázi

Pro separace enantiomerů vybraných látek byly použity následující MF: (i) MeOH/deionizovaná voda, (ii) MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10), (iii) MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) a (iv) MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) v různých objemových poměrech. Během měření se postupovalo izokraticky od složení MF MeOH/vodná složka (90/10) (v/v) do (10/90) (v/v).

V Tabulkách 1 - 4 jsou uvedeny retenční časy t_R , retenční faktory k , faktory selektivity α a rozlišení R pro analyzované chirální látky při různém složení MF. Analýzou jednotlivých enantiomerů látek bylo zjištěno, že D forma byla eluována dříve než L forma. Vysvětlivky k Tabulkám 1 - 4: * = analyt byl eluován s mrtvým časem kolony, o = analyt nebyl do 60 min eluován. V případě separace hodnoty t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu enantiomeru.

Z Tabulky 1 vyplývá, že zvolená MF (MeOH/deionizovaná H₂O) není vhodná pro separaci většiny vybraných látek, jelikož u většiny analytů nebyla pozorována ani částečná separace. Pouze analyty α -methyl-DL-tyrosin, *t*-BOC-DL-tryptofan a DL-fenylalanin vykazovaly částečnou enantioseparaci s hodnotami rozlišení 0,46; 0,75 a 0,47 v MF MeOH/H₂O (10/90) (v/v). Doby analýz v této MF dosahovaly velmi krátkých hodnot, zpravidla do 5 min. Deionizovaná voda jako složka MF byla použita především pro ověření úspěšnosti přípravy „coatované“ SF.

Tab. 1. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných chirálních látek při různém složení MF MeOH/H₂O (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

MeOH/H ₂ O + 0,1 mg ml ⁻¹ SBE-β-CD (v/v)																
NÁZEV ANALYTU	<i>t_R</i> (min)	<i>k</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>t_R</i> (min)	<i>k</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>t_R</i> (min)	<i>k</i>	<i>α</i>	<i>R</i>	<i>t_R</i> (min)	<i>k</i>	<i>α</i>	<i>R</i>
	90/10 (v/v)				80/20 (v/v)				70/30 (v/v)				60/40 (v/v)			
DL -Tyr	7,08	2,75	-	-	3,08	0,63	-	-	2,65	0,40	-	-	2,52	0,33	-	-
α-methyl-DL-Tyr	3,19	0,69	-	-	2,39	0,26	-	-	2,32	0,23	-	-	2,22	0,17	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Trp	9,26	3,90	-	-	3,39	0,79	-	-	3,06	0,62	-	-	2,84	0,50	-	-
Gly-DL-Trp	1,92	0,02	-	-	3,20	0,69	-	-	3,12	0,65	-	-	2,63	0,39	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Phe	2,00	0,06	-	-	2,99	0,58	-	-	2,71	0,43	-	-	2,60	0,38	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-4-Cl-Phe	2,00	0,06	-	-	2,90	0,53	-	-	2,99	0,58	-	-	2,64	0,40	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Gly-DL-Phe	*	-	-	-	2,72	0,44	-	-	2,42	0,28	-	-	2,32	0,23	-	-
<i>Z</i> -DL-2-F-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
<i>Z</i> -DL-3-F-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
DL-Tyr	2,21	0,17	-	-	2,13	0,13	-	-	2,12	0,12	-	-	2,12	0,12	-	-
α-methyl-DL-Tyr	2,11	0,12	-	-	2,10	0,11	-	-	2,11	0,12	-	-	2,12	0,12	1,33	0,46
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	*	-	-	-	1,91	0,01	-	-	2,18	0,15	-	-	2,64	0,40	-	-
DL-Trp	2,53	0,34	-	-	2,50	0,32	-	-	2,55	0,35	-	-	2,64	0,40	-	-
Gly-DL-Trp	2,64	0,40	-	-	2,78	0,47	-	-	2,84	0,50	-	-	2,91	0,54	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	*	-	-	-	2,51	0,33	1,18	0,30	3,29	0,74	1,26	0,71	4,59	1,43	0,83	0,75
DL-Phe	2,28	0,21	-	-	2,21	0,17	-	-	2,26	0,20	-	-	2,24	0,19	1,26	0,47
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	*	-	-	-	1,92	0,02	-	-	2,18	0,15	-	-	2,82	0,49	-	-
DL-4-Cl-Phe	2,36	0,25	-	-	2,33	0,23	-	-	2,39	0,26	-	-	2,48	0,31	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	*	-	-	-	1,92	0,02	-	-	2,44	0,29	-	-	3,30	0,75	-	-
Gly-DL-Phe	2,27	0,20	-	-	2,31	0,22	-	-	2,32	0,23	-	-	2,41	0,28	-	-
<i>Z</i> -DL-2-F-Phe	*	-	-	-	1,94	0,03	-	-	2,51	0,33	-	-	3,44	0,82	-	-
<i>Z</i> -DL-3-F-Phe	*	-	-	-	1,92	0,02	-	-	2,35	0,24	-	-	3,13	0,66	-	-

Tab. 2. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných chirálních látek při různém složení MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

NÁZEV ANALYTU	MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) + 0,1 mg ml ⁻¹ SBE- β -CD (v/v)															
	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	90/10 (v/v)				80/20 (v/v)				70/30 (v/v)				60/40 (v/v)			
DL-Tyr	21,29	10,26	-	-	11,60	5,14	-	-	6,97	2,69	-	-	5,14	1,72	-	-
α -methyl-DL-Tyr	18,80	8,95	-	-	10,83	4,73	-	-	6,76	2,58	-	-	5,08	1,69	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	1,90	0,01	6,99	0,57	*	-	-	0,93	1,94	0,03	3,39	0,41	2,24	0,19	1,49	0,54
DL-Trp	26,63	13,09	-	-	14,60	6,72	-	-	9,00	3,76	-	-	6,58	2,48	1,06	0,50
Gly-DL-Trp	38,46	19,35	-	-	20,32	9,75	-	-	11,91	5,30	-	-	8,66	3,58	1,03	0,26
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	1,93	0,02	2,50	0,48	*	*	-	0,56	1,95	0,03	3,67	0,38	2,32	0,23	1,74	0,87
DL-Phe	18,82	8,96	-	-	10,51	4,56	-	-	6,51	2,44	-	-	4,83	1,56	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	2,14	0,13	-	-
DL-4-Cl-Phe	20,09	9,63	-	-	11,56	5,12	-	-	7,32	2,87	-	-	5,71	2,02	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	0,55
Gly-DL-Phe	o	-	-	-	o	-	-	-	9,86	4,22	1,05	0,51	7,07	2,74	1,07	0,58
Z-DL-2-F-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	2,06	0,09	-	-
Z-DL-3-F-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
DL-Tyr	3,76	0,99	-	-	3,54	0,87	-	-	3,41	0,80	-	-	3,23	0,71	1,10	0,51
α -methyl-DL-Tyr	3,90	1,06	-	-	3,69	0,95	1,11	0,62	3,65	0,93	1,15	0,88	3,71	0,96	1,19	1,13
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	3,91	1,07	1,55	2,02	6,41	2,39	1,45	3,14	10,87	4,75	1,58	3,93	17,64	8,33	1,58	4,39
DL-Trp	5,24	1,77	1,14	0,97	5,23	1,77	1,17	1,34	5,24	1,77	1,22	1,72	5,23	1,77	1,27	2,14
Gly-DL-Trp	7,04	2,72	1,10	0,85	7,50	2,97	1,12	1,27	8,11	3,29	1,16	1,63	8,67	3,59	1,19	2,04
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	4,74	1,51	1,73	3,05	8,84	3,68	1,86	4,36	17,23	8,12	1,69	5,01	31,24	15,53	1,64	5,05
DL-Phe	3,61	0,91	-	-	3,38	0,79	-	-	3,22	0,70	-	-	3,12	0,65	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	3,51	0,86	-	-	5,45	1,88	-	-	8,66	3,58	1,04	0,28	13,11	5,94	1,09	0,76
DL-4-Cl-Phe	4,93	1,61	-	-	5,02	1,66	-	-	5,09	1,69	-	-	5,07	1,68	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	3,85	1,04	1,21	0,67	7,47	2,95	1,07	0,56	11,98	5,05	1,26	1,98	20,18	9,68	12,37	2,57
Gly-DL-Phe	5,29	1,80	1,12	0,84	5,21	1,76	1,26	1,18	5,21	1,76	1,18	1,45	5,24	1,77	1,20	1,62
Z-DL-2-F-Phe	3,45	0,83	-	-	6,09	2,22	1,22	1,18	11,88	5,29	1,24	1,75	22,17	10,73	1,26	2,32
Z-DL-3-F-Phe	3,05	0,61	-	-	4,91	1,60	1,12	0,60	8,66	3,58	1,15	0,97	15,02	6,95	1,16	1,35

Tab. 3. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných chirálních látek při různém složení MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) + 0,1 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

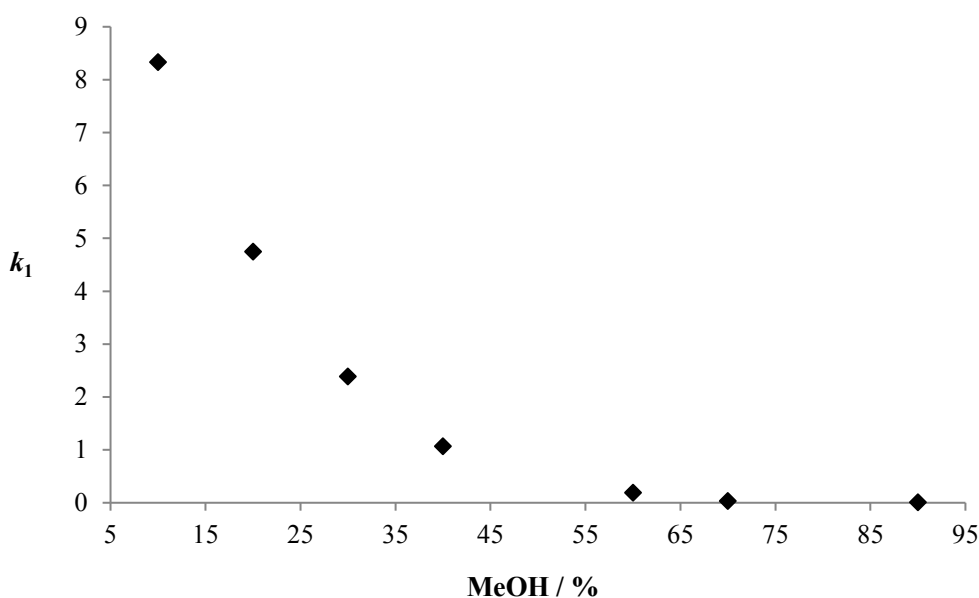
NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	90/10 (v/v)				80/20 (v/v)				70/30 (v/v)				60/40 (v/v)			
DL-Tyr	2,94	0,56	-	-	2,50	0,32	-	-	2,30	0,22	-	-	2,20	0,16	-	-
α -methyl-DL-Tyr	2,52	0,33	-	-	2,31	0,22	-	-	2,20	0,16	-	-	2,15	0,14	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	1,92	0,02	-	-
DL-Trp	3,34	0,77	-	-	2,72	0,44	-	-	2,46	0,30	-	-	2,37	0,25	-	-
Gly-DL-Trp	5,38	1,85	-	-	3,64	0,93	-	-	3,01	0,59	-	-	2,76	0,46	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	*	-	-	-	1,95	0,03	-	-	2,07	0,10	-	-	2,21	0,17	-	-
DL-Phe	2,85	0,51	-	-	2,45	0,30	-	-	2,27	0,20	-	-	2,19	0,16	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	2,03	0,07	-	-
DL-4-Cl-Phe	2,91	0,54	-	-	2,46	0,30	-	-	2,27	0,20	-	-	2,21	0,17	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	1,92	0,02	-	-	2,00	0,06	-	-	8,86	3,69	-	-	11,27	4,96	-	-
Gly-DL-Phe	3,92	1,07	-	-	2,95	0,56	-	-	2,57	0,36	-	-	2,41	0,28	-	-
Z-DL-2-F-Phe	2,06	0,09	-	-	2,29	0,21	-	-	2,66	0,41	-	-	3,02	0,60	-	-
Z-DL-3-F-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
NÁZEV ANALYTU	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
DL-Tyr	2,10	0,11	-	-	2,10	0,11	-	-	2,10	0,11	-	-	2,17	0,15	-	-
α -methyl-DL-Tyr	2,08	0,10	-	-	2,08	0,10	-	-	2,09	0,11	-	-	2,10	0,11	1,36	0,48
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	2,59	0,37	-	-	3,14	0,66	1,20	0,66	4,04	1,14	1,22	1,23	5,33	1,82	1,23	1,60
DL-Trp	2,59	0,37	-	-	2,43	0,29	-	-	2,51	0,33	-	-	2,61	0,38	-	-
Gly-DL-Trp	2,67	0,41	-	-	2,73	0,44	-	-	2,81	0,49	-	-	2,92	0,54	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	3,10	0,64	1,25	0,94	4,35	1,30	1,30	1,67	6,55	2,47	1,31	2,20	10,25	4,42	1,29	2,27
DL-Phe	2,15	0,14	-	-	2,18	0,15	-	-	2,23	0,18	-	-	2,31	0,22	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	2,53	0,34	-	-	3,10	0,64	-	-	3,98	1,11	-	-	5,37	1,84	-	-
DL-4-Cl-Phe	2,21	0,17	-	-	2,27	0,20	-	-	2,35	0,24	-	-	2,46	0,30	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	4,55	1,41	-	-	5,08	1,69	-	-	5,67	2,00	-	-	6,10	2,23	-	-
Gly-DL-Phe	2,30	0,22	-	-	2,30	0,22	-	-	2,35	0,24	-	-	2,35	0,24	1,13	0,34
Z-DL-2-F-Phe	3,20	0,69	-	-	3,32	0,76	-	-	4,70	1,49	-	-	7,01	2,71	1,07	0,50
Z-DL-3-F-Phe	2,47	0,31	-	-	3,10	0,64	-	-	4,21	1,23	-	-	6,14	2,25	-	-

Tab. 4. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných chirálních látek při různém složení MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

NÁZEV ANALYTU	MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) + 0,1 mg ml ⁻¹ SBE- β -CD (v/v)															
	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	90/10 (v/v)				80/20 (v/v)				70/30 (v/v)				60/40 (v/v)			
DL-Tyr	5,28	1,79	-	-	4,03	1,13	-	-	3,50	0,85	-	-	3,04	0,61	-	-
α -methyl-DL-Tyr	2,73	0,44	-	-	2,50	0,32	-	-	2,34	0,24	-	-	2,25	0,19	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Trp	6,43	2,40	-	-	5,51	1,92	-	-	3,95	1,09	-	-	3,34	0,77	-	-
Gly-DL-Trp	3,82	1,02	-	-	2,84	0,50	-	-	2,39	0,26	-	-	2,28	0,21	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Phe	1,92	0,02	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-4-Cl-Phe	1,93	0,02	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	2,80	0,48	-	-	2,34	0,24	-	-	2,25	0,19	-	-	*	-	-	-
Gly-DL-Phe	3,00	0,59	-	-	2,45	0,30	-	-	2,15	0,14	-	-	2,13	0,13	-	-
Z-DL-2-F-Phe	1,90	0,01	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Z-DL-3-F-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
DL-Tyr	2,46	0,30	-	-	2,28	0,21	-	-	2,19	0,16	-	-	2,06	0,09	2,67	0,71
α -methyl-DL-Tyr	2,13	0,13	-	-	2,12	0,12	-	-	2,15	0,14	-	-	2,11	0,12	1,42	0,53
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Trp	2,58	0,37	-	-	2,42	0,28	-	-	2,49	0,32	-	-	2,52	0,33	-	-
Gly-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-Phe	2,31	0,22	-	-	2,22	0,17	-	-	2,34	0,24	-	-	2,65	0,40	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
DL-4-Cl-Phe	1,95	0,03	-	-	2,20	0,16	-	-	2,34	0,24	-	-	2,44	0,29	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	2,35	0,24	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Gly-DL-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Z-DL-2-F-Phe	2,15	0,14	-	-	2,24	0,19	-	-	2,49	0,32	-	-	2,68	0,42	-	-
Z-DL-3-F-Phe	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-

Z Tabulky 2 je zřejmé, že změnou vodné složky MF (z H₂O na vodný roztok kyseliny mravenčí o pH = 2,10) bylo docíleno výrazné změny enantioselektivity připravené SF. U čtyř látek byla pozorována částečná separace a u sedmi analytů bylo dosaženo separace na základní linii. Naopak látky DL-fenylalanin a DL-4-Cl-fenylalanin za těchto podmínek nevykazovaly ani částečnou separaci.

Typické chromatografické chování pro RP-HPLC vykazuje například *t*-BOC-DL-tyrosin, kdy s klesajícím obsahem organického modifikátoru v MF pozorujeme nárůst retenčních časů. S rostoucí retencí dochází k postupnému zvyšování rozlišení, přičemž v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH = 2,10) (40/60) (v/v) došlo k separaci na základní linii s dobou analýzy 7 minut. Na Obrázku 5 je znázorněno chromatografické chování *t*-BOC-DL-tyrosinu v reverzním separačním módu. Tento trend pozorujeme i u dalších blokových aminokyselin *t*-BOC-DL-tryptofanu, *t*-BOC-DL-fenylalaninu a *t*-BOC-4-Cl-DL-fenylalaninu.



Obr. 5. Závislost retenčního faktoru k_1 prvního eluujícího enantiomeru na množství MeOH v MF pro *t*-BOC-DL-Tyr na připravené SBE- β -CD SF v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v).

V případě analytů Z-DL-2-F-fenylalanin a Z-DL-3-F-fenylalanin je možné sledovat vliv na retenci a hodnotu rozlišení daný různou polohou atomu fluoru v molekule. Z-DL-2-F-fenylalanin byl separován na základní linii v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH = 2,10) (20/80) (v/v) s dobou analýzy 17 minut, zatímco Z-DL-3-F-fenylalanin se za těchto podmínek podařilo separovat pouze částečně, avšak vykazuje nižší retenci. Dalším snížením obsahu organického modifikátoru v MF došlo u obou analytů ke zvýšení hodnoty rozlišení, avšak Z-DL-3-F-fenylalanin se nepodařilo separovat na základní linii, ale pouze částečně, a to s hodnotou rozlišení 1,35.

Z nederivatizovaných aminokyselin se na základní linii podařilo separovat pouze enantiomery DL-tryptofanu, a to v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH = 2,10) (20/80) (v/v) s dobou analýzy 8 minut.

Pro aminokyseliny DL-tyrosin a DL-fenylalanin byla zjištěna nižší enantioselektivita připravené SBE- β -CD SF než pro jejich derivatizované analogy. Blokování aminoskupiny má pozitivní vliv na enantioseparaci, ať už se jedná o *tert*-butyloxykarbonylovou (*t*-BOC) nebo benzyloxykarbonylovou (Z) skupinu.

Dipeptidy glycyl-DL-fenylalanin a glycyl-DL-tryptofan vykazují nižší retenci (do 30 a 40 objemových procent obsahu organického modifikátoru) s rostoucí hodnotou rozlišení při snižování obsahu organického modifikátoru v MF. Za těchto podmínek (pH vodné složky 2,10) jsou kladně nabitě, enantioseparaci pravděpodobně napomáhají iontové interakce mezi záporně nabitým CS a molekulou analytu. Oproti tomu pak v dalších použitých MF (pH vodných složek 4,70 a 8,80) nepozorujeme žádnou separaci – viz Tabulka 3 a 4.

α -methyl-DL-tyrosin byl za podmínek pH vodné složky 2,10 částečně separován s nejvyšším dosaženým rozlišením 1,13 v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v). S klesajícím množstvím organického modifikátoru v MF roste hodnota rozlišení enantiomerů.

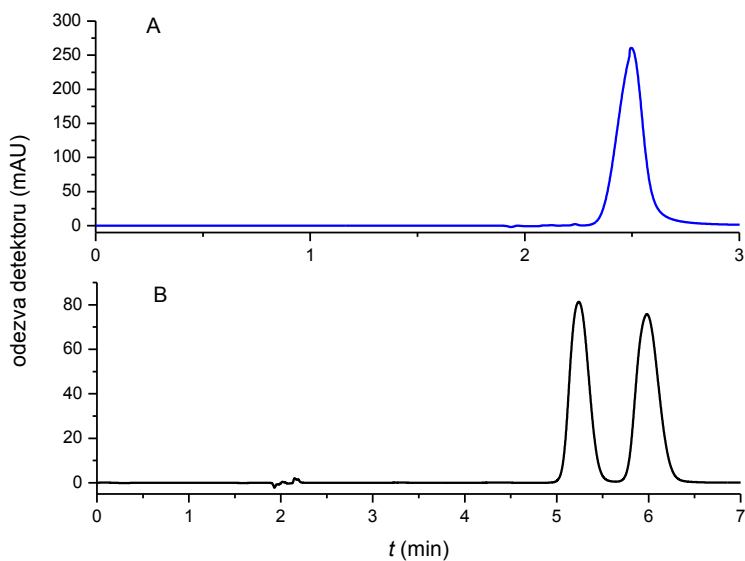
Tabulky 3 a 4 ukazují, že změna pH vodné složky MF neměla příznivý vliv na enantioseparaci. V MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) byly na základní linii separovány pouze dva analyty, *t*-BOC-DL-tyrosin a *t*-BOC-DL-tryptofan, s hodnotami rozlišení 1,60 a 1,67 v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (10/90) (v/v) a MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (30/70) (v/v). V porovnání s MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) vidíme vyšší enantioselektivitu při pH vodné

složky 2,10, kdy jsou blokovány aminokyseliny elektroneutrální.

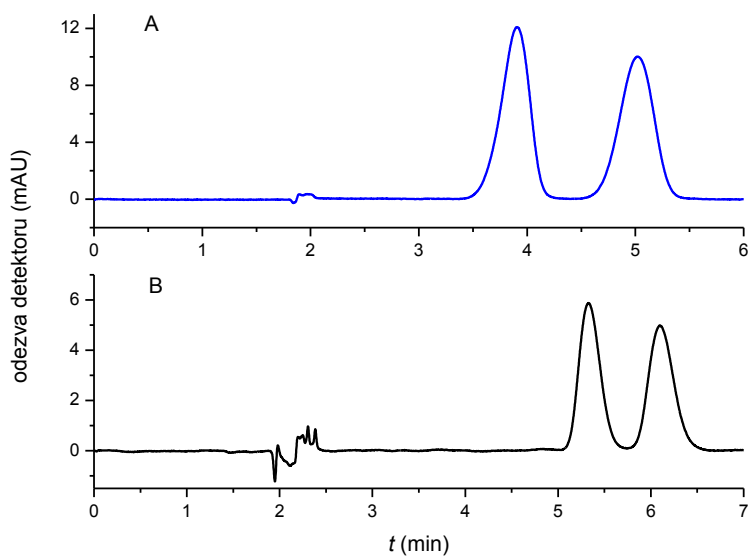
Dále byly pozorovány částečné separace u látek α -methyl-DL-tyrosin, glycyl-DL-fenylalanin a Z-DL-2-F-fenylalanin v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (10/90) (v/v). Zatímco Z-DL-2-F-fenylalanin vykazuje alespoň částečnou enantioseparaci, u strukturně podobného Z-DL-3-F-fenylalaninu nebyl pozorován ani náznak separace. Poloha atomu fluoru v pozici 3 negativně ovlivňuje enantioseparaci. Oba tyto analyty mají v pH vodné složky 4,70 i 8,80 záporný náboj, takže může docházet k odpuzování mezi CS a molekulou analytu, což souvisí i s nízkou retencí.

Na Obrázku 6 jsou uvedeny chromatogramy enantioseparace DL-tryptofanu znázorňující vliv pH MF na separaci. V MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (20/80) (v/v) byly enantiomery separovány na základní linii, zatímco použití téhož objemového poměru MF, avšak s jinou vodnou složkou (octanový pufr o pH 4,70), způsobilo ztrátu enantioselektivity a enantiomery nebyly separovány. V MF o pH vodné složky 4,70 pozorujeme nízkou retenci z důvodu nedostatečné interakce analytu se SF. K tomu mohla přispět i disociace karboxylové skupiny ($pK_A = 2,38$), a tudíž vzájemné odpuzování mezi CS a analytem.

Na Obrázku 7 jsou znázorněny chromatogramy enantioseparace *t*-BOC-DL-tyrosinu za optimalizovaných podmínek v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) a MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (10/90) (v/v). V obou použitých MF došlo k separaci na základní linii s dobou analýzy 6 a 7 min, můžeme tedy říci, že pro enantioseparaci *t*-BOC-DL-tyrosinu jsou vhodné obě MF.

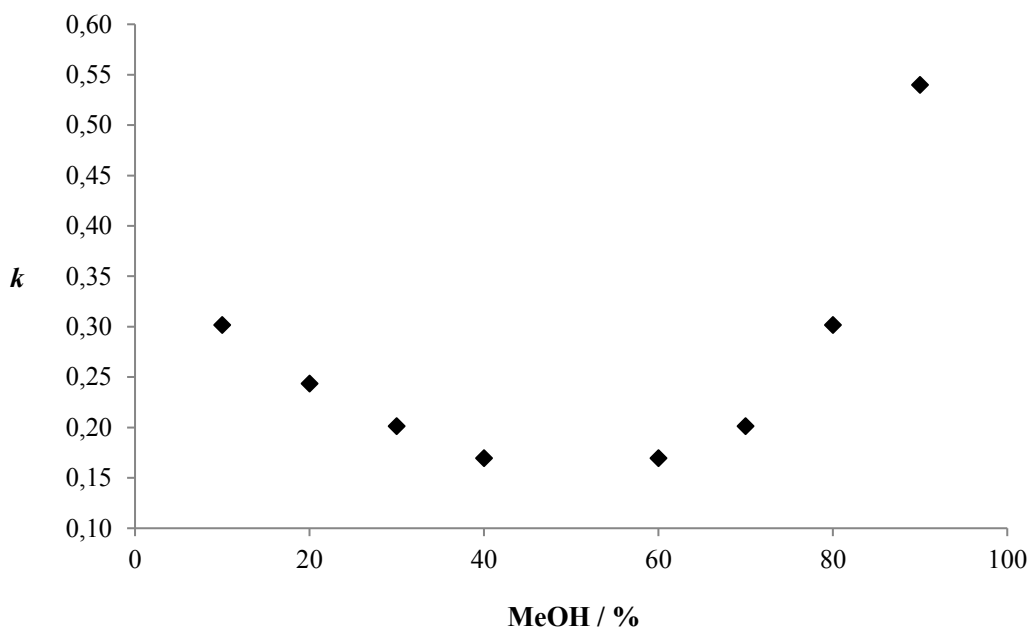


Obr. 6. Chromatogramy enantioseparace DL-tryptofanu v MF MeOH/20mM octan amonný (pH = 4,70) (20/80) (v/v) (A) a v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH = 2,10) (20/80) (v/v) (B) na připravené SBE- β -CD SF, v případě separace enantiomery eluují v pořadí D-tryptofan a L-tryptofan, průtok 1 ml min⁻¹, UV detekce při 260 nm.



Obr. 7. Chromatogramy enantioseparace *t*-BOC-DL-tyrosinu v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH = 2,10) (40/60) (v/v) (A) a v MF MeOH/20mM octan amonný (pH = 4,70) (10/90) (v/v) (B) na připravené SBE- β -CD SF, separované enantiomery eluují v pořadí *t*-BOC-D-tyrosin a *t*-BOC-L-tyrosin, průtok 1 ml min⁻¹, UV detekce při 260 nm.

Na Obrázku 8 je znázorněno retenční chování DL-4-Cl-fenylalaninu v závislosti na složení MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) v různých objemových poměrech při použití připravené SBE- β -CD SF. Na obrázku je vidět pokles retence se snižujícím se obsahem organického modifikátoru do 60 objemových procent (typické pro HILIC) následovaný nárůstem při přechodu do reverzního separačního módu, tzv. „U-tvar“ křivky.



Obr. 8. Závislost retenčního faktoru k na množství MeOH v MF pro DL-4-Cl-fenylalanin na připravené SBE- β -CD SF v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70).

Použitím MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) téměř vymizela schopnost SF separovat vybrané analyty – viz Tabulka 4. Za těchto podmínek pozorujeme pouze částečnou separaci analytů DL-tyrosinu a α -methyl-DL-tyrosinu s hodnotami rozlišení 0,71 a 0,53 v MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (10/90) (v/v). Ostatní analyty nevykazovaly ani náznak enantioseparace. V této MF byly doby analýz velmi krátké. Vzhledem k hodnotě mrtvého času a faktu, že s klesajícím obsahem organického

modifikátoru v MF klesá retence většiny analytů, často dochází k eluci s mrtvým časem kolony. Tento výsledek můžeme vysvětlit tím, že za podmínek pH vodné složky 8,80 nese volná karboxylová skupina v molekule analytu záporný náboj, tudíž dochází k odpuzování se záporně nabitým SBE- β -CD na povrchu SF. Zároveň můžeme zanedbat možné interakce s kladně nabitými místy na SF, kde nedošlo k navázání SBE- β -CD, jelikož tyto interakce nejsou z důvodu sterického bránění poměrně objemnou molekulou SBE- β -CD příliš pravděpodobné.

4.1.2 Chirální separace na C18 stacionární fázi s přídavkem SBE- β -CD do mobilní fáze

Pro separace enantiomerů vybraných látek na achirální C18 SF a přídavku CS do mobilní fáze byly jako MF použity: (i) MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10), (ii) MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) a (iii) MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) v různých objemových poměrech. Během měření se postupovalo izokraticky od složení MF MeOH/vodná složka (40/60) (v/v) do (10/90) (v/v). Mobilní fáze MeOH/vodná složka (90/10) (v/v) až (60/40) (v/v) nebyly použity z důvodu použití nepolární SF a předpokládané velmi nízké retenci testovaných analytů.

V případě přídavku SBE- β -CD do mobilní fáze již nebylo použito složení MF MeOH/deionizovaná H₂O. Toto složení MF sloužilo k ověření úspěšnosti „coatovacího“ procesu na připravené SBE- β -CD SF. Z důvodu vyšší stability separačního systému je vhodnější použití složek MF o přesně definovaném složení a pH. Koncentrace chirálního selektoru SBE- β -CD v MF byla 0,5 mg ml⁻¹.

V Tabulkách 5 - 7 jsou uvedeny retenční časy t_R , retenční faktory k , faktory selektivity α a rozlišení R pro analyzované chirální látky při různém složení MF.

V MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) došlo k částečné separaci pouze u glycyl-DL-tryptofanu v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v) s hodnotou rozlišení 0,58, ale s dlouhou dobou analýzy 40 min. Ostatní látky nebyly za těchto podmínek separovány. Dále můžeme vidět velké rozdíly v retenci blokových a neblokových aminokyselin. Blokové aminokyseliny *t*-BOC-DL-tyrosin, *t*-BOC-DL-tryptofan, *t*-BOC-DL-fenylalanin, *t*-BOC-4-Cl-DL-fenylalanin, *Z*-DL-2-F-fenylalanin a *Z*-DL-3-F-fenylalanin byly eluovány s několikanásobně delším retenčním

časem oproti svým neblokovaným analogům. Tento trend pozorujeme i v případě použití MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) a MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80). Je to dáno tím, že analyty obsahující blokovací skupinu (*t*-BOC, *Z*) jsou méně polární, a tudíž vykazují vyšší afinitu k nepolární C18 SF.

V MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) se výrazně zvýšila retence *Z*-DL-3-F-fenylalaninu, a to i vůči strukturně podobnému *Z*-DL-2-F-fenylalaninu, kdy doba analýzy *Z*-DL-3-F-fenylalaninu v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (40/60) (*v/v*) byla 44 min. V MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) byly retence obou analytů srovnatelné. Za podmínek pH vodných složek 4,70 a 8,80 nedošlo k separaci žádného z vybraných chirálních analytů, přičemž u všech zkoumaných látek bylo pozorováno reverzní chromatografické chování.

Tab. 5. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných chirálních látek při různém složení MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) na C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF.

MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) + 0,5 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
DL-Tyr	*	-	-	-	1,66	0,04	-	-	2,03	0,28	-	-	4,36	1,74	-	-
α -methyl-DL-Tyr	1,66	0,04	-	-	1,93	0,21	-	-	2,75	0,73	-	-	10,47	5,58	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	10,87	5,84	-	-	31,02	18,51	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-
DL-Trp	2,07	0,30	-	-	2,87	0,81	-	-	5,24	2,30	-	-	24,96	14,70	-	-
Gly-DL-Trp	2,12	0,33	-	-	3,11	0,96	-	-	6,12	2,85	-	-	32,93	19,71	1,04	0,58
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	47,74	29,03	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-Phe	1,88	0,18	-	-	2,25	0,42	-	-	3,20	1,01	-	-	8,44	4,31	-	-
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	44,88	27,23	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DL-4-Cl-Phe	2,76	0,74	-	-	4,12	1,59	-	-	7,64	3,81	-	-	30,26	18,03	-	-
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	6,79	3,27	-	-	16,46	9,35	-	-	52,44	31,98	-	-	-	-	-	-
Gly-DL-Phe	2,02	0,27	-	-	2,69	0,69	-	-	4,48	1,82	-	-	17,85	10,23	-	-
Z-DL-2-F-Phe	o	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z-DL-3-F-Phe	o	-	-	-	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* ... analyt byl eluován s mrtvým časem kolony

o ... analyt nebyl do 60 min eluován

- ... analýza nebyla provedena

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu enantiomeru

Tab. 6. Retenční čas (t_R) a retenční faktor (k) analyzovaných chirálních látek při různém složení MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (v/v) na C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF.

MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) + 0,5 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
	40/60 (v/v)		30/70 (v/v)		20/80 (v/v)		10/90 (v/v)	
DL-Tyr	1,65	0,04	1,73	0,09	1,89	0,19	2,32	0,46
α -methyl-DL-Tyr	1,70	0,07	1,81	0,14	2,08	0,31	2,91	0,83
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	5,47	2,44	12,59	6,92	31,98	19,11	-	-
DL-Trp	2,17	0,36	2,75	0,73	3,99	1,51	7,52	3,73
Gly-DL-Trp	2,05	0,29	2,56	0,61	3,78	1,38	8,15	4,13
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	20,66	11,99	68,44	42,04	o	-	-	-
DL-Phe	1,99	0,25	2,27	0,43	2,84	0,79	4,19	1,64
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	21,25	12,36	61,50	37,68	o	-	-	-
DL-4-Cl-Phe	3,16	0,99	4,45	1,80	6,90	3,34	13,63	7,57
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	2,92	0,84	5,28	2,32	12,68	6,97	o	-
Gly-DL-Phe	1,98	0,25	2,33	0,47	3,03	0,91	4,98	2,13
Z-DL-2-F-Phe	9,87	5,21	11,50	6,23	15,60	8,81	-	-
Z-DL-3-F-Phe	39,61	23,91	o	-	-	-	-	-

- ... analýza nebyla provedena

o ... analyt nebyl do 60 min eluován

Tab. 7. Retenční čas (t_R) a retenční faktor (k) analyzovaných chirálních látek při různém složení MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (v/v) na C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF.

MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) + 0,5 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k	t_R (min)	k
	40/60 (v/v)		30/70 (v/v)		20/80 (v/v)		10/90 (v/v)	
DL-Tyr	1,62	0,02	1,69	0,06	1,82	0,14	2,14	0,35
α -methyl-DL-Tyr	1,68	0,06	1,79	0,13	2,02	0,27	2,65	0,67
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	3,55	1,23	7,03	3,42	17,49	10,00	51,45	31,36
DL-Trp	2,15	0,35	2,70	0,70	3,87	1,43	6,85	3,31
Gly-DL-Trp	2,13	0,34	2,60	0,64	3,91	1,46	7,35	3,62
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	10,88	5,84	32,26	19,29	o	-	-	-
DL-Phe	2,01	0,26	2,35	0,48	2,96	0,86	4,24	1,67
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	12,24	6,70	33,25	19,91	o	-	-	-
DL-4-Cl-Phe	3,25	1,04	4,88	2,07	7,81	3,91	13,60	7,55
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	13,99	7,80	18,66	10,74	53,05	32,36	-	-
Gly-DL-Phe	2,13	0,34	2,44	0,53	3,28	1,06	5,11	2,21
Z-DL-2-F-Phe	19,21	11,08	o	-	-	-	-	-
Z-DL-3-F-Phe	23,96	14,07	o	-	-	-	-	-

- ... analýza nebyla provedena

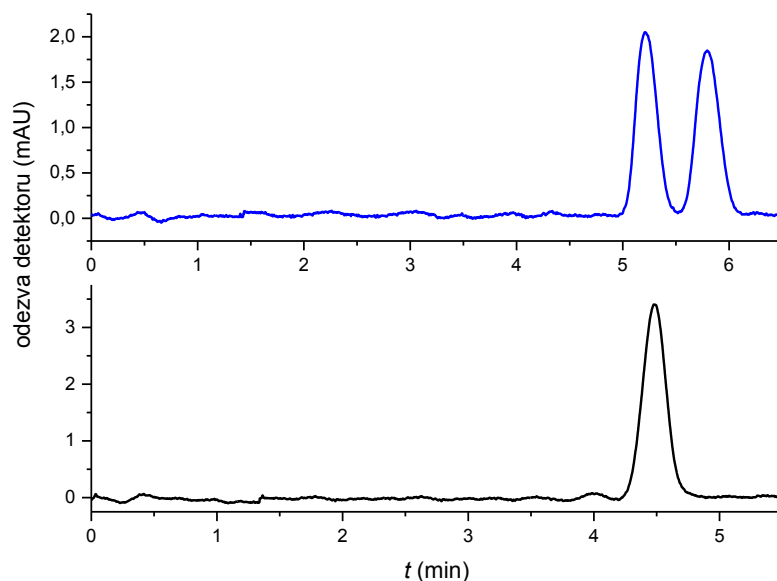
o ... analyt nebyl do 60 min eluován

4.1.3 Porovnání separace chirálních látek na připravené SBE- β -CD stacionární fázi a C18 stacionární fázi s přídavkem SBE- β -CD do mobilní fáze

Porovnáním naměřených hodnot chirální sady vzorků na obou separačních systémech byla zjištěna významně vyšší enantiosektivita připravené SBE- β -CD SF, a to ve všech použitých MF. Naopak retence byla nižší pro separační systém s C18 SF. S nízkými retencemi může souviset i nízká enantiosektivita systému, kdy nedošlo k rozdělení analytů z důvodu nedostatku času pro separaci. Výjimkou byly blokové aminokyseliny *t*-BOC-DL-tyrosin, *t*-BOC-DL-fenylalanin a *t*-BOC-4-Cl-DL-fenylalanin, kde jsme naopak pozorovali delší dobu analýz v systému s C18 SF. Výrazně delší retenci jsme v tomto separačním systému zaznamenali také u analytů Z-DL-2-F-fenylalanin a Z-DL-3-F-fenylalanin, a to ve všech testovaných MF.

Pro separaci vybraných aminokyselin a jejich derivátů a dipeptidů se jako nejvhodnější jeví MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) na připravené SBE- β -CD SF, ve které se podařilo separovat sedm analytů na základní linii a čtyři analyty byly separovány částečně.

Na Obrázku 9 jsou uvedeny chromatogramy enantioseparace analytu glycyl-DL-fenylalaninu na připravené SBE- β -CD SF a C18 SF s přídavkem SBE- β -CD do mobilní fáze v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (20/80) (*v/v*). Na připravené SBE- β -CD SF pozorujeme částečnou separaci s hodnotou rozlišení 1,45, zatímco na C18 SF s přídavkem CS do MF nedošlo ani k částečné separaci analytu.



Obr. 9. Chromatogramy enantioseparace glycyl-DL-fenylalaninu v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH = 2,10) (20/80) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF (A) a C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF (B), v případě separace enantiomery eluují v pořadí glycyl-D-fenylalanin a glycyl-L-fenylalanin, průtok 1 ml min⁻¹, UV detekce při 260 nm.

4.2 Separace směsí achirálních analytů

Pro studium separačních schopností a selektivity SBE- β -CD pro achirální látky byly vybrány čtyři sady blokových a neblokových dipeptidů. Dipeptidy v jednotlivých směších byly tvořeny vždy stejnými aminokyselinami, ale vzájemně se lišily jejich pořadím. Směs pak byla tvořena dvěma dipeptidy, např. H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH.

4.2.1 Separace směsí achirálních analytů na připravené SBE- β -CD stacionární fázi

Pro separace vybraných směsí achirálních látek byly použity následující MF:
 (i) MeOH/deionizovaná voda, (ii) MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10),
 (iii) MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) a (iv) MeOH/10mM octan amonný

(pH 8,80) v různých objemových poměrech. Během měření se postupovalo izokraticky od složení MF MeOH/vodná složka (90/10) (v/v) do (10/90) (v/v).

V Tabulkách 8 - 11 jsou uvedeny retenční časy t_R , retenční faktory k , faktory selektivity α a rozlišení R pro analyzované směsi achirálních látek při různém složení MF. V tabulkách jsou jednotlivé analyty ze směsí seřazeny dle svého elučního pořadí.

V MF MeOH/deionizovaná H_2O pozorujeme separaci na základní linii pouze u neblokovaných dipeptidů. Dle Tabulky 8 byla směs H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH separována na základní linii v MF MeOH/deionizovaná H_2O (80/20) (v/v) s krátkou dobou analýzy 3 min a hodnotou rozlišení 1,53. Za stejných podmínek a taktéž s krátkou dobou analýzy (3 min) byla na základní linii separována směs H-Ala-Phe-OH/H-Phe-Ala-OH s hodnotou rozlišení 1,74. Přítomnost *benzyloxykarbonylové* skupiny (Z) způsobila ztrátu separace. Pouze v MF MeOH/deionizovaná H_2O (10/90) (v/v) byla pozorována částečná separace směsi Z-Ala-Tyr-OH/Z-Tyr-Ala-OH s hodnotou rozlišení 0,47. Směs Z-Ala-Phe-OH/Z-Phe-Ala-OH nevykazovala ani náznak separace. Za těchto podmínek pozorujeme reverzní chování analytů, kdy s klesajícím množstvím organického modifikátoru v MF roste retence. Přesto však byly hodnoty retenčních časů nízké a v mnoha případech došlo k eluci analytů s mrtvým časem kolony.

Z Tabulky 9 je zřejmé, že MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) je nejvhodnější k separaci směsí neblokovaných dipeptidů. Ve všech testovaných objemových poměrech MF došlo k separaci na základní linii. Naopak u blokovaných dipeptidů nepozorujeme žádnou separaci, pouze částečnou separaci v případě Z-Ala-Phe-OH/Z-Phe-Ala-OH v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v) s hodnotou rozlišení 0,64. Retenční časy neblokovaných dipeptidů se s klesajícím množstvím organického modifikátoru v MF snižují. Nejkratší retence a nejvyšších hodnot rozlišení bylo dosaženo v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v). Retence blokovaných dipeptidů s klesajícím množstvím organického modifikátoru v MF naopak roste.

Tab. 8. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných směsí achirálních analytů při různém složení MF MeOH/H₂O (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

MeOH/H₂O + 0,1 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	90/10 (v/v)				80/20 (v/v)				70/30 (v/v)				60/40 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	2,31	0,22	1,73	1,53	2,41	0,28	1,36	1,13	2,07	0,10	1,90	0,84
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Z-Tyr-Ala-OH																
H-Ala-Phe-OH	*	-	-	-	2,27	0,20	1,75	1,74	2,27	0,20	1,55	1,34	-	-	-	-
H-Phe-Ala-OH																
Z-Ala-Phe-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Z-Phe-Ala-OH																
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	2,25	0,19	-	-	2,31	0,22	-	-	2,31	0,22	-	-	2,25	0,19	1,32	0,48
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	1,98	0,05	-	-	2,25	0,19	1,37	0,47
Z-Tyr-Ala-OH																
H-Ala-Phe-OH	2,30	0,22	-	-	2,34	0,24	-	-	2,36	0,25	-	-	2,36	0,25	1,24	0,53
H-Phe-Ala-OH																
Z-Ala-Phe-OH	*	-	-	-	1,90	0,01	-	-	2,10	0,11	-	-	2,95	0,56	-	-
Z-Phe-Ala-OH																

* ... analyt byl eluován s mrtvým časem kolony

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu dipeptidu

Tab. 9. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných směsí achirálních analytů při různém složení MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) + 0,1 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	90/10 (v/v)				80/20 (v/v)				70/30 (v/v)				60/40 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	25,35	12,41	1,23	3,20	13,85	6,33	1,29	2,82	8,27	3,38	1,32	2,53	5,89	2,12	1,42	2,81
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Z-Tyr-Ala-OH																
H-Ala-Phe-OH	23,42	11,39	1,18	2,35	13,16	5,96	1,23	2,05	7,93	3,20	1,26	2,01	5,74	2,04	1,34	2,49
H-Phe-Ala-OH																
Z-Ala-Phe-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-
Z-Phe-Ala-OH																
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	4,00	1,12	1,93	2,77	3,65	0,93	2,47	6,67	3,43	0,81	3,16	8,18	3,29	0,74	3,91	9,48
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	2,60	0,38	-	-	3,38	0,79	-	-	4,69	1,48	-	-
Z-Tyr-Ala-OH																
H-Ala-Phe-OH	3,99	1,11	1,76	4,06	3,65	0,93	2,13	5,61	3,40	0,80	2,58	6,75	3,26	0,72	3,00	7,60
H-Phe-Ala-OH																
Z-Ala-Phe-OH	2,26	0,20	-	-	2,84	0,50	-	-	3,87	1,05	-	-	5,55	1,94	1,12	0,64
Z-Phe-Ala-OH																

* ... analyt byl eluován s mrtvým časem kolony

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu dipeptidu

Tab. 10. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných směsí achirálních analytů při různém složení MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) + 0,1 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	90/10 (v/v)				80/20 (v/v)				70/30 (v/v)				60/40 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	3,31	0,75	1,31	1,60	2,78	0,47	1,19	0,63	2,56	0,35	-	-	2,41	0,28	-	-
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	1,93	0,02	-	-	2,01	0,06	-	-
Z-Tyr-Ala-OH																
H-Ala-Phe-OH	3,05	0,61	1,30	1,35	2,76	0,46	-	-	2,51	0,33	-	-	2,40	0,27	-	-
H-Phe-Ala-OH																
Z-Ala-Phe-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	*	-	-	-	2,01	0,06	-	-
Z-Phe-Ala-OH																
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	2,29	0,21	-	-	2,28	0,21	-	-	2,28	0,21	-	-	2,38	0,26	-	-
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH	2,29	0,21	-	-	2,59	0,37	-	-	3,11	0,65	-	-	3,76	0,99	1,17	0,93
Z-Tyr-Ala-OH																
H-Ala-Phe-OH	2,31	0,22	-	-	2,33	0,23	-	-	2,36	0,25	-	-	2,39	0,26	-	-
H-Phe-Ala-OH																
Z-Ala-Phe-OH	2,38	0,26	-	-	2,83	0,50	-	-	3,63	0,92	-	-	5,16	1,73	-	-
Z-Phe-Ala-OH																

* ... analyt byl eluován s mrtvým časem kolony

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu dipeptidu

Tab. 11. Retenční čas (t_R) a retenční faktor (k) analyzovaných směsí achirálních analytů při různém složení MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF.

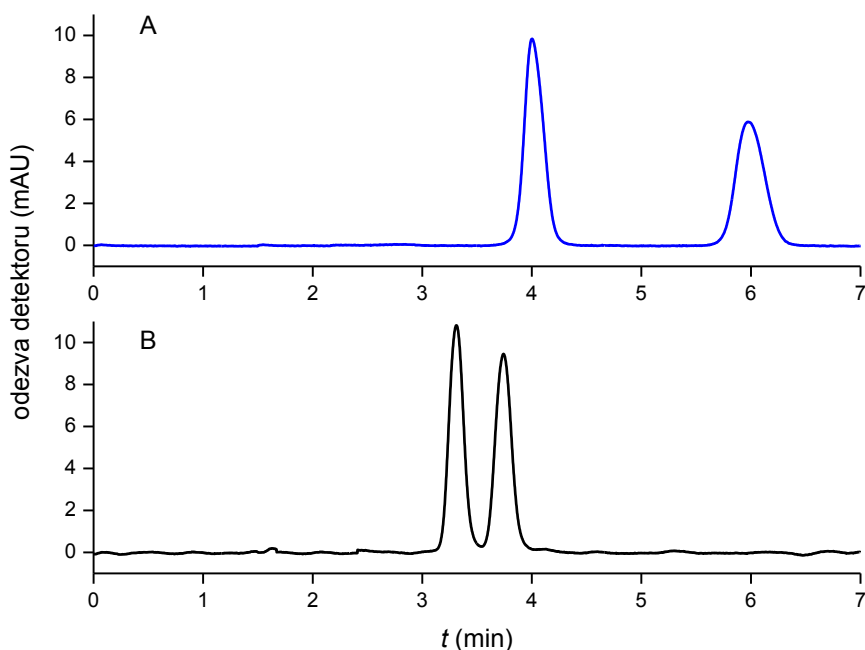
**MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80)
+ 0,1 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)**

NÁZEV ANALYTU	t_R (min) 90/10 (v/v)	k	t_R (min) 80/20 (v/v)	k	t_R (min) 70/30 (v/v)	k	t_R (min) 60/40 (v/v)	k
H-Ala-Tyr-OH	2,43	0,29	2,22	0,17	1,94	0,03	*	-
H-Tyr-Ala-OH								
Z-Ala-Tyr-OH	*	-	*	-	*	-	*	-
Z-Tyr-Ala-OH								
H-Ala-Phe-OH	2,29	0,21	*	-	*	-	*	-
H-Phe-Ala-OH								
Z-Ala-Phe-OH	*	-	*	-	*	-	*	-
Z-Phe-Ala-OH								
	40/60 (v/v)		30/70 (v/v)		20/80 (v/v)		10/90 (v/v)	
H-Ala-Tyr-OH	*	-	*	-	*	-	*	-
H-Tyr-Ala-OH								
Z-Ala-Tyr-OH	*	-	*	-	*	-	*	-
Z-Tyr-Ala-OH								
H-Ala-Phe-OH	*	-	*	-	*	-	*	-
H-Phe-Ala-OH								
Z-Ala-Phe-OH	*	-	*	-	*	-	*	-
Z-Phe-Ala-OH								

* ... analyt byl eluován s mrtvým časem kolony

Tabulky 10 a 11 znázorňují chromatografické chování vybraných směsí dipeptidů v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) a MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80). Je zřejmé, že tyto MF nejsou k separaci vhodné, jak pro neblokované dipeptidy, tak pro jejich blokované analogy. Za podmínek pH vodné složky 4,70 došlo k separaci na základní linii pouze u H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (90/10) (v/v) s hodnotou rozlišení 1,60. Částečnou separaci pak pozorujeme u Z-Ala-Tyr-OH/Z-Tyr-Ala-OH v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (10/90) (v/v) a u H-Ala-Phe-OH/H-Phe-Ala-OH v MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (90/10) (v/v). V ostatních případech nepozorujeme žádnou separaci. Za podmínek pH vodné složky 8,80 nedošlo ani k částečné separaci u žádné směsi dipeptidů. Toto chování může být vysvětleno tím, že za podmínek vysokého pH jsou dipeptidy negativně nabitě a neprobíhá iontová interakce s povrchem SF, který je též záporně nabitý. V obou zvolených pH vodných složek (4,70 i 8,80) pozorujeme velmi krátké retenční časy a ve většině případů došlo k eluci s mrtvým časem kolony.

Na Obrázku 10 jsou znázorněny chromatogramy separace H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH v optimalizovaných MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) a MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (90/10) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF. V obou použitých MF došlo k separaci na základní linii s krátkou dobou analýzy 7 a 4 min, přičemž hodnota rozlišení v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) je vyšší než s použitím MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (90/10) (v/v). Lze konstatovat, že pro separaci této achirální směsi jsou obě testované MF použitelné.



Obr. 10. Chromatogramy separace H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH = 2,10) (40/60) (v/v) (A) a v MF MeOH/20mM octan amonný (pH = 4,70) (90/10) (v/v) (B) na připravené SBE- β -CD SF, jednotlivé analyty jsou eluovány v uvedeném pořadí, průtok 1 ml min⁻¹, UV detekce při 260 nm.

4.2.2 Separace směsí achirálních analytů na C18 stacionární fázi s přidavkem SBE- β -CD do mobilní fáze

Pro separace vybraných směsí achirálních látek na C18 SF s přidavkem CS do mobilní fáze byly jako MF použity: (i) MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10), (ii) MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) a (iii) MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) v různých objemových poměrech. Během měření se postupovalo izokraticky od složení MF MeOH/vodná složka (40/60) (v/v) do (10/90) (v/v). Mobilní fáze MeOH/vodná složka (90/10) (v/v) až (60/40) (v/v) nebyly použity z důvodu použití nepolární SF a předpokládané velmi nízké retenci testovaných analytů.

Stejně tak jako v případě testování chirální sady vzorků již nebylo použito

složení MF MeOH/deionizovaná H₂O, které sloužilo k ověření úspěšnosti „coatovacího“ procesu na připravené SBE- β -CD SF.

V Tabulce 12 jsou uvedena chromatografická data pro směsi dipeptidů ve všech testovaných MF, kde jsou uvedeny retenční časy t_R , retenční faktory k , faktory selektivity α a rozlišení R analyzovaných látek při různém složení MF.

V MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) se na základní linii podařilo separovat směsi H-Ala-Phe-OH/H-Phe-Ala-OH a Z-Ala-Phe-OH/Z-Phe-Ala-OH, zatímco směs H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH byla separována pouze částečně. Retence neblokovaných dipeptidů dosahovaly nízkých hodnot, zatímco blokované dipeptidy byly eluovány s několikanásobně vyššími retenčními časy. Směs H-Ala-Phe-OH/H-Phe-Ala-OH se podařilo separovat na základní linii v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (30/70) (v/v) s krátkou dobou analýzy 3,5 min, blokovaný analog Z-Ala-Phe-OH/Z-Phe-Ala-OH se sice také podařilo separovat na základní linii dokonce již v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v), ale s velmi dlouhou dobou analýzy 53 minut.

V MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) se na základní linii podařilo separovat tři ze čtyř analyzovaných směsí dipeptidů. U směsi H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH nebyla pozorována ani částečná separace. Stejně jako v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) byly zaznamenány podstatně kratší retenční časy neblokovaných směsí dipeptidů oproti jejich blokovaným analogům. Tento jev si opět můžeme vysvětlit tím, že analyty obsahující blokovací skupinu (Z) jsou méně polární, a tudíž vykazují vyšší afinitu k nepolární C18 SF.

Mobilní fáze MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) se jeví jako nejvhodnější pro separaci vybraných směsí achirálních dipeptidů, jelikož se podařilo rozdělit tři ze čtyř směsí na základní linii a zbývající směs H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH byla separována alespoň částečně v MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (10/90) (v/v) s rozlišením 1,06. I v této MF pozorujeme krátké retenční časy směsí neblokovaných dipeptidů, zatímco jejich blokované analogy eluují s několikanásobně delší retencí.

Tab. 12. Retenční čas (t_R), retenční faktor (k), faktor selektivity (α) a rozlišení (R) analyzovaných směsí achirálních analytů při různém složení MF MeOH/vodná složka (v/v) na C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF.

MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) + 0,5 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	*	-	-	-	1,90	0,19	2,16	1,38	3,45	1,17	1,95	0,71
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH																
Z-Tyr-Ala-OH	11,61	6,30	-	-	38,42	23,16	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-
H-Ala-Phe-OH																
H-Phe-Ala-OH	1,78	0,12	2,33	1,01	2,05	0,29	2,41	2,98	2,93	0,84	2,13	4,75	o	-	-	-
Z-Ala-Phe-OH																
Z-Phe-Ala-OH	43,09	26,10	1,14	2,46	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-

MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) + 0,5 mg ml⁻¹ SBE- β -CD (v/v)

NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	1,60	0,01	-	-	1,68	0,06	-	-	2,19	0,38	-	-
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH																
Z-Tyr-Ala-OH	7,05	3,43	1,14	1,45	17,91	10,26	1,20	2,46	o	-	-	-	o	-	-	-
H-Ala-Phe-OH																
H-Phe-Ala-OH	1,84	0,16	0,25	0,52	2,04	0,28	1,68	1,03	2,51	0,58	1,59	1,43	4,04	1,54	1,44	1,55
Z-Ala-Phe-OH																
Z-Phe-Ala-OH	24,87	14,64	1,21	2,64	o	-	-	-	o	-	-	-	o	-	-	-

Tab. 12 pokr.

MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) + 0,5 mg ml⁻¹ SBE-β-CD (v/v)

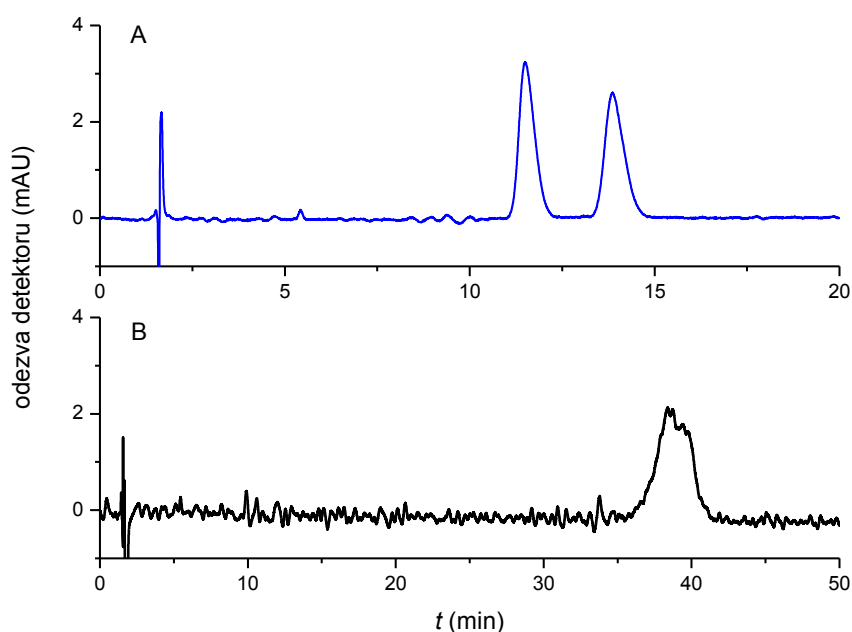
NÁZEV ANALYTU	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R	t_R (min)	k	α	R
	40/60 (v/v)				30/70 (v/v)				20/80 (v/v)				10/90 (v/v)			
H-Ala-Tyr-OH	*	-	-	-	1,71	0,08	1,63	0,54	2,00	0,26	1,62	0,56	2,60	0,64	1,63	1,06
H-Tyr-Ala-OH																
Z-Ala-Tyr-OH	5,22	2,28	1,16	0,73	11,49	6,23	1,24	2,67	35,63	21,41	1,30	3,89	o	-	-	-
Z-Tyr-Ala-OH																
H-Ala-Phe-OH	2,25	0,42	0,54	0,52	2,89	0,82	1,33	1,41	4,49	1,82	1,31	1,40	8,05	4,06	1,29	2,54
H-Phe-Ala-OH																
Z-Ala-Phe-OH	16,49	9,37	1,27	2,47	53,33	32,54	1,28	4,32	o	-	-	-	o	-	-	-
Z-Phe-Ala-OH																

o ... analyt nebyl do 60 min eluován

* ... analyt byl eluován s mrtvým časem kolony

v případě separace t_R a k odpovídají prvnímu eluujícímu dipeptidu

Na Obrázku 11 jsou uvedeny chromatogramy separace Z-Ala-Tyr-OH/Z-Tyr-Ala-OH znázorňující vliv pH vodné složky MF na selektivitu separačního systému. V MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (30/70) (v/v) byla směs separována na základní linii, zatímco použití téhož objemového poměru MF, avšak s jinou složkou vodné fáze (kyselina mravenčí o pH 2,10), způsobilo ztrátu selektivity. Na chromatogramu pozorujeme výrazné prodloužení doby analýzy a ztrátu selektivity separačního systému.



Obr. 11. Chromatogramy separace Z-Ala-Tyr-OH/Z-Tyr-Ala-OH v MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (30/70) (v/v) (A) a v MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (30/70) (v/v) (B) na C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF, na chromatogramu A jsou analyty eluovány v uvedeném pořadí, průtok 1 ml min⁻¹, UV detekce při 260 nm.

4.2.3 Porovnání separace směsí achirálních látek na připravené SBE- β -CD stacionární fázi a C18 stacionární fázi s přidavkem SBE- β -CD do mobilní fáze

Porovnáním výsledků separací směsí achirálních analytů naměřených na obou SF lze říci, že vyšší selektivitu vykazuje separační systém tvořený C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF. Zatímco na připravené SBE- β -CD SF se na základní linii podařilo separovat pouze neblokované směsi dipeptidů, na C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF se na základní linii podařilo separovat tři ze čtyř vybraných směsí.

Pro separaci směsí dipeptidů na připravené SBE- β -CD SF se jako nejvhodnější MF jeví MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10), zatímco v druhém typu separačního systému se jako nejvhodnější ukázala MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80).

Pro většinu MF platí, že vyšší retenci vykazovaly směsi neblokovaných dipeptidů na připravené SBE- β -CD SF, zatímco v druhém typu separačního systému byla vyšší retence pozorována u směsí blokových dipeptidů.

Pro separaci směsí neblokovaných dipeptidů H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH a H-Ala-Phe-OH/H-Phe-Ala-OH je nejvhodnější MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (40/60) (v/v) na připravené SBE- β -CD SF. Pro separaci směsí blokových dipeptidů Z-Ala-Tyr-OH/Z-Tyr-Ala-OH a Z-Ala-Phe-OH/Z-Phe-Ala-OH je nejvhodnější MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (40/60) a (30/70) (v/v) při použití C18 SF a přidavku SBE- β -CD do MF.

5 Závěr

V rámci této práce byla připravena dynamicky „coatovaná“ SBE- β -CD CSF. Následně byly studovány separační schopnosti a selektivita této připravené CSF na chirální sadě vzorků, jež byla tvořena aminokyselinami, jejich deriváty a dipeptidy a achirální sadě vzorků, kterou tvořily směsi neblokovaných a blokových dipeptidů. Připravená CSF byla stabilní pro více než 500 nástřiků.

Dalším testovaným systémem bylo použití C18 SF s přidavkem SBE- β -CD jako CS do MF. Na základě získaných výsledků byla zvolena koncentrace 0,5 mg ml⁻¹ SBE- β -CD v MF.

V případě chirální sady vzorků vykazoval vyšší enantioselektivitu systém tvořený připravenou SBE- β -CD SF. Z testovaných MF byla nejvhodnější MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v), kdy bylo na základní linii separováno sedm ze třinácti analytů a další čtyři analyty byly separovány částečně. Ostatní testované MF (MeOH/deionizovaná H₂O, MeOH/20mM octan amonný o pH 4,70 a MeOH/10mM octan amonný o pH 8,80) byly pro separaci vybraných analytů méně vhodné.

Mobilní fáze MeOH/H₂O poskytla pouze tři částečné enantioseparace u analytů α -methyl-DL-tyrosin, *t*-BOC-DL-tryptophan a DL-fenylalanin, a to v MF MeOH/H₂O (10/90) (v/v). Zároveň byly všechny analyty eluovány s nízkými retencemi, velmi často došlo k eluci s mrtvým časem kolony. V MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) (10/90) (v/v) bylo dosaženo tří částečných separací a dvou separací na základní linii. Změnou vodné složky MF tedy došlo ke zlepšení enantioselektivity systému, stejně tak se zvýšila i retence analytů. Další zvýšení pH MF mělo za následek snížení enantioselektivity systému. V MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80) (10/90) (v/v) jsme pozorovali pouze dvě částečné separace u analytů DL-tyrosin a α -methyl-DL-tyrosin. Ostatní analyty nevykazovaly ani náznak separace a zároveň došlo ke snížení retence. Většina látek byla eluována s mrtvým časem kolony.

Použití C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do MF není pro separaci testovaných chirálních látek vhodné, jelikož v testovaných MF nedošlo ani k jedné enantioseparaci na základní linii.

V případě achirálních směsí dipeptidů se jako nejvhodnější jeví použití separačního systému C18 SF s přidavkem SBE- β -CD do mobilní fáze, a to v MF MeOH/10mM octan amonný (pH 8,80), kdy se na základní linii podařilo separovat tři

ze čtyř vybraných achirálních směsí, zatímco čtvrtá směs byla separována částečně.

Pro směsi neblokovaných dipeptidů byla vhodná i MF MeOH/kyselina mravenčí (pH 2,10) (10/90) (v/v) s připravenou SBE- β -CD SF. V tomto systému byly směsi separovány na základní linii s dobou analýzy do 8 minut. Zvýšením pH MF došlo ke snížení selektivity separačního systému. V MF MeOH/20mM octan amonný (pH 4,70) byla na základní linii separována pouze směs H-Ala-Tyr-OH/H-Tyr-Ala-OH, zatímco druhá ze směsí neblokovaných dipeptidů H-Ala-Phe-OH/H-Phe-Ala-OH byla separována pouze částečně. Dalším zvýšením pH MF zcela vymizela schopnost připravené SBE- β -CD SF separovat achirální směsi dipeptidů a nebyly pozorovány žádné separace.

Ze získaných výsledků je patrné, že se v porovnávaných separačních systémech uplatňují rozdílné interakční a retenční mechanismy. Pro chirální separace aminokyselin a dipeptidů je vhodnější použít připravenou SBE- β -CD SF, zatímco pro achirální separace směsí dipeptidů C18 SF a SBE- β -CD přidat do MF.

6 Použitá literatura

1. **Kolektiv autorů.** *Analýza chirálních sloučenin.* Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007.
2. **Li, X.; McGuffin, V. L.:** Thermodynamics and Kinetics of Chiral Separations with β -Cyclodextrin Stationary Phase: I. Effect of Mobile Phase Composition. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 30, 937 – 964 (2007).
3. **Riesová, M.; Geryk, R.; Kalíková, K.; Šlechtová, T.; Voborná, M.; Martínková, M.; Bydžovská, A.; Tesařová, E.:** Direct CE and HPLC methods for enantioseparation of tryptophan and its unnatural derivatives. *Separation and Purification Technology* 158, 24 - 30 (2016).
4. **Wang, R.; Ong, T.; Ng, S.:** Synthesis of cationic β -cyclodextrin derivatives and their applications as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1203, 185 - 192 (2008).
5. **Červinka, O.:** Chiralita a pojmy s ní související. *Chemické Listy* 93, 294 – 305 (1999).
6. **Ali, I.; Kumerer, K.; Aboul-Enein, H. Y.:** Mechanistic Principles in Chiral Separations Using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* 63, 295 – 307 (2006).
7. **Desiderio, C.; Fanali, S.:** Use of negatively charged sulfobutyl ether- β -cyclodextrin for enantiomeric separation by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 716, 183 - 196 (1995).
8. **Geryk, R.; Kalíková, K.; Vozka, J.; Plecitá, D.; Schmid, M. G.; Tesařová, E.:** Enantioselective potential of chiral stationary phases based on immobilized polysaccharides in reversed phase mode. *Journal of Chromatography A* 1363, 155 – 161 (2014).
9. **Tesařová, E.; Bosáková, Z.:** Comparison of enantioseparation of selected benzodiazepine and phenothiazine derivatives on chiral stationary phases based on β -cyclodextrin and macrocyclic antibiotics. *Journal of Separation Science* 26, 661 – 668 (2003).

10. **Guan, J.; Yang, J.; Bi, Y.; Shi, S.; Yan, F.; Li, F.:** Determination of the enantiomeric impurity in S-(-)pantoprazole using high performance liquid chromatography with sulfobutylether-beta-cyclodextrin as chiral additive. *Journal of Separation Science* 31, 288 - 293 (2008).
11. **Lai, X.; Tang, W.; Ng, S.:** Novel cyclodextrin chiral stationary phases for high performance liquid chromatography enantioseparation: Effect of cyclodextrin type. *Journal of Chromatography A* 1218, 5597 - 5601 (2011).
12. **Vozka, J.; Kalíková, K.; Janečková, L.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.:** Chiral HPLC Separation on Derivatized Cyclofructan versus Cyclodextrin Stationary Phases. *Analytical Letters* 45, 2344 - 2358 (2012).
13. **Štulík, K. a kolektiv:** *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
14. **Kučerová, G.; Kalíková, K.; Procházková, H.; Popr, M.; Jindřich, J.; Coufal, P.; Tesařová, E.:** Chromatographic Characterization of a New Cationic β -CD Based Stationary Phase Prepared by Dynamic Coating. *Chromatographia* 79, 529 - 536 (2016).
15. **Ilisz, I.; Aranyi, A.; Pataj, Z.; Péter, A.:** Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 69, 28 – 41 (2012).
16. **Flack, H. D.:** Louis Pasteur's discovery of molecular chirality and spontaneous resolution in 1848, together with a complete review of his crystallographic and chemical work. *Acta Crystallographica Section A* 65, 371 – 389 (2009).
17. **Stalcup, A. M.:** Chiral Separations. *Annual Review of Analytical Chemistry* 3, 341 - 363 (2010).
18. **Nováková, L.; Douša, M. a kolektiv:** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Europrint, Praha 2013.
19. <https://cs.wikipedia.org/wiki/Izomerie> [cit. 12.2.2017]
20. **Kalíková, K.; Riesová, M.; Tesařová, E.:** Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE. *Central European Journal of Chemistry* 10(3), 450 - 471 (2012).

21. **Armstrong, D. W.; Ward, T. J.; Armstrong, R. D.; Beesley, T. E.:** Separation of Drug Stereoisomers by the Formation of β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Science* 232, 1132 - 1135 (1986).
22. **Tang, M.; Zhang, J.; Zhuang, S.; Liu, W.:** Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation. *Trends in Analytical Chemistry* 39, 180 – 193 (2012).
23. **Bressolle, F.; Audran, M.; Pham, T. N.; Vallon, J. J.:** Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *Journal of Chromatography B* 687, 303 - 336 (1996).
24. **Owens, P. K.; Fell, A. F.; Coleman, M. W.; Berridge, J. C.:** Chiral Recognition in Liquid Chromatography Utilising Chargeable Cyclodextrins for Resolution of Doxazosin Enantiomers. *Chirality* 9, 184 - 190 (1997).
25. **Řezanka, M.:** Monosubstituted Cyclodextrins as Precursors for Further Use. *European Journal of Organic Chemistry* 5322 – 5334 (2016).
26. **Qiu, H.; Liang, X.; Sun, M.; Jiang, S.:** Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 3307 - 3322 (2011).
27. **Crini, G.; Morcellet, M.:** Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *Journal of Separation Science* 25, 789 - 813 (2002).
28. **Olsson, C.; Westman, G.:** Direct Dissolution of Cellulose: Background, Means and Applications, DOI: 10.5772/52144 (2013).
<http://www.intechopen.com/books/cellulose-fundamental-aspects/direct-dissolution-of-cellulose-background-means-and-applications> [cit. 12.2.2017]
29. **Horský, J.; Jindřich, J.:** Cyklodextriny ve světě polymerů. *Chemické Listy* 107, 769 - 776 (2013).
30. **Kraus, T.:** Cyklodextriny. In: *Supramolekulární chemie*. **Kohout, L.; Hniličková, J.; Slavíková, B. (Ed.)**. Praha: UOCHB AV ČR, 2004, s. 215-233.
31. **Schmitt, T.; Engelhardt, H.:** Charged and Uncharged Cyclodextrins as Chiral Selectors in Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* 37, 475 - 481 (1993).
32. **Mikuš, P.; Šebesta, R.; Kaniánsky, D.; Sališová, M.:** Cyklodextríny a ich komplexy - štruktúra a interakcie. *Chemické Listy* 96, 693 - 697 (2002).

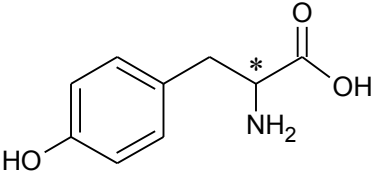
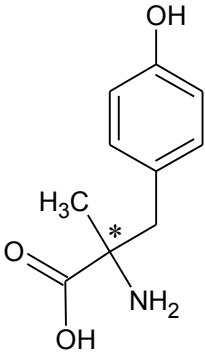
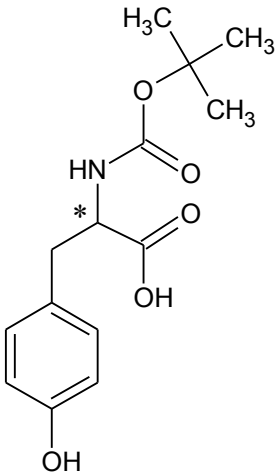
33. **Owens, P. K.; Fell, A. F.; Coleman, M. W.; Berridge, J. C.:** Method development in liquid chromatography with a charged cyclodextrin additive for chiral resolution of *rac*-amlodipine utilising a central composite design. *Chirality* 8, 466 - 476 (1996).
34. **Xiao, Y.; Ng, S.; Tan, T. T. Y.; Wang, Y.:** Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography. *Journal of Chromatography A* 1269, 52 - 68 (2012).
35. **Zhou, J.; Tang, J.; Tang, W.:** Recent development of cationic cyclodextrins for chiral separation. *Trends in Analytical Chemistry* 65, 22 - 29 (2015).
36. <http://www.hplc.cz/Chiral/index.htm> [cit. 19.2.2017]
37. **Skanchy, D. J.; Xie, G. H.; Tait, R. J.; Luna, E.; Demarest, Ch.; Stobaugh, J. F.:** Application of sulfobutylether- β -cyclodextrin with specific degree of substitution for the enantioseparation of pharmaceutical mixtures by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 2638 - 2649 (1999).
38. **Jensen, C. E. de M.; Santos, R. A. S.; Denadai, A. M. L.; Santos, C. F. F.; Braga, A. N. G.; Sinisterra, R. D.:** Pharmaceutical Composition of Valsartan: β -Cyclodextrin: Physico-Chemical Characterization and Anti-Hypertensive Evaluation. *Molecules* 15, 4067 – 4084 (2010).
39. **Han, X.; Yao, T.; Liu, Y.; Larock, R. C.; Armstrong, D. W.:** Separation of chiral furan derivatives by liquid chromatography using cyclodextrin-based chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* 1063, 111 - 120 (2005).
40. **Qin, Q.; Zhang, S.; Zhang, W. G.; Zhang, Z. B.; Xiong, Y. J.; Guo, Z. Y.; Fan, J.; Run-Zheng, S.; Finlow, D.; Yin, Y.:** The impact of silica gel pore and particle sizes on HPLC column efficiency and resolution for an immobilized, cyclodextrin-based, chiral stationary phase. *Journal of Separation Science* 33, 2582 – 2589 (2010).
41. **Kučerová, G.; Kalíková, K.; Riesová, M.; Tesařová, E.:** Effect of Buffer Constituents on Retention and Separation in Achiral and Chiral HPLC Systems with β -Cyclodextrin-Based Stationary Phase. *Chromatographia* 78, 917 - 921 (2015).

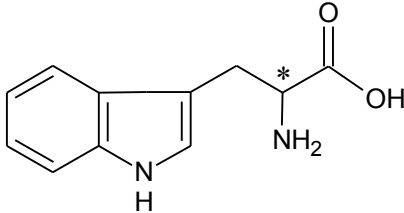
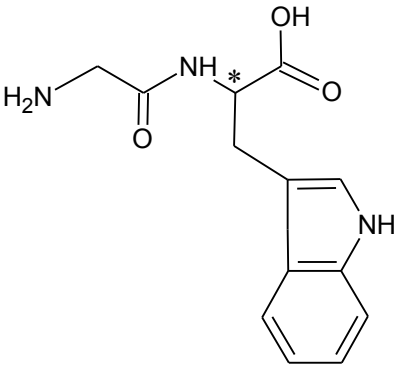
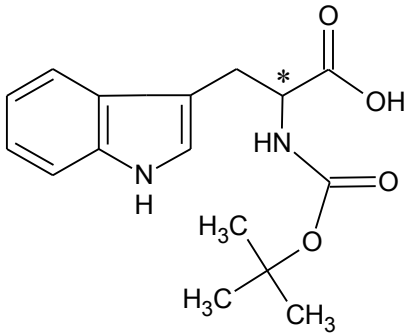
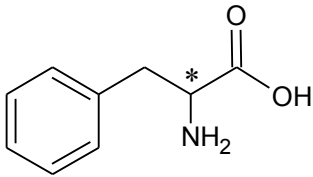
42. **Varga, G.; Fodor, G.; Ilisz, I.; Szemán, J.; Visy, J.; Szenté, L.; Péter, A.:** Comparison of separation performances of novel β -cyclodextrin-based chiral stationary phases in high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70, 71 – 76 (2012).
43. **Cai, H.; Vigh, G.:** Capillary electrophoretic separation of teak base enantiomers using the single-isomer heptakis-(2,3-dimethyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin as resolving agent and methanol as background electrolyte solvent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18, 615 - 621 (1998).
44. **Sgorbini, C. C. B.; Cordero, Ch.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Bicchi, C.:** Enantioselective Gas Chromatography with Derivatized Cyclodextrins in the Flavour and Fragrance Field. *Organic & Biomolecular Chemistry* 14, 9760 - 9767 (2016).
45. **Pragadheesh, V. S.; Yadav, A.; Chanotya, Ch. S.:** Role of substituents in cyclodextrin derivatives for enantioselective gas chromatographic separation of chiral terpenoids in the Essentials oils of *Mentha spicata*. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1002, 30 - 41 (2015).
46. **Hancu, G.; Papp, L. A.; Rusu, A.:** Chiral Separation of the Enantiomers of Omeprazole and Pantoprazole by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* 78, 279 - 284 (2015).
47. **Zhou, R. D.; Li, L. S.; Cheng, B. P.; Nie, G. Z.; Zhang, H. F.:** Enantioseparation and Determination of Propranolol in Human Plasma on a New Derivatized beta-Cyclodextrin-Bonded Phase by HPLC. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 42, 1002 - 1009 (2014).
48. **Li, X.; Zhou, Z.:** Enantioseparation performance of novel benzimido-beta-cyclodextrins derivatized by ionic liquid as chiral stationary phases. *Analytica Chimica Acta* 819, 122 - 129 (2014).
49. **Popr, M.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J.:** A complete series of 6-deoxy-monosubstituted tetraalkylammonium derivatives of α -, β -, and γ -cyclodextrin with 1, 2, and 3 permanent positive charges. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 10, 1390-1396 (2014).

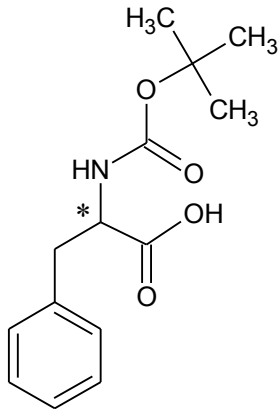
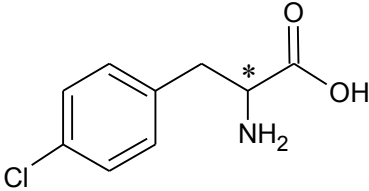
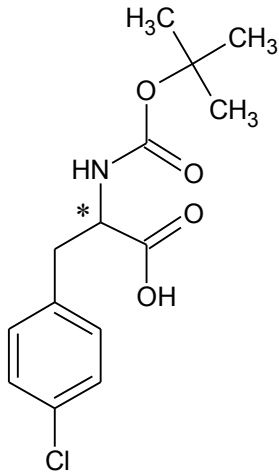
50. **Kučerová, G.; Procházková, H.; Kalíková, K.; Tesařová, E.:** Sulfobutylether- β -cyclodextrin as a chiral selector for separation of amino acids and dipeptides in chromatography. *Journal of Chromatography A* 1467, 356 - 362 (2016).
51. **Chankvetadze, B.; Endresz, G.; Bergenthal, D.; Blaschke, G.:** Enantioseparation of mianserine analogues using capillary electrophoresis with neutral and charged cyclodextrin buffer modifiers. ^{13}C NMR study of the chiral recognition mechanism. *Journal of Chromatography A* 717, 245 - 253 (1995).
52. **Tait, R. J.; Skanchy, D. J.; Thompson, D. P.; Chetwyn, N. C.; Dunshee, D. A.; Rajewski, R. A.; Stella, V. J.; Stobaugh, J. F.:** Characterization of sulphoalkyl ether derivatives of β -cyclodextrin by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 10, 615 - 622 (1992).
53. **Morin, P.; Bellessort, D.; Dreux, M.; Troin, Y.; Gelas, J.:** Chiral resolution of functionalized piperidine enantiomers by capillary electrophoresis with native, alkylated and anionic beta-cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* 796, 375 - 383 (1998).
54. <http://www.zycydextrin.com/sulfobutyl-beta-cyclodextrin/> [cit. 24.3.2017]
55. **I. Ligand, Pharmaceuticals:** What is Captisol? I. CyDex Pharmaceuticals (Ed.), 1 - 8 (2015).
56. **Gioia, S. D.; Trapani, A.; Mandracchia, D.; Giglio, E. D.; Cometa, S.; Mangini, V.; Arnesano, F.; Belgiovine, G.; Castellani, S.; Pace, L.; Lavecchia, M. A.; Trapani, G.; Conese, M.; Puglisi, G.; Cassano, T.:** Intranasal delivery of dopamine to the striatum using glykol chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin based nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 94, 180 - 193 (2015).
57. **Morris, A. A.; Mueller, S. W.; Rower, J. E.; Washburn, T.; Kiser, T. H.:** Evaluation of Sulfobutylether- β -Cyclodextrin Exposure in a Critically Ill Patient Receiving Intravenous Posaconazole While Undergoing Continuous Venovenous Hemofiltration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 6653 - 6656 (2015).

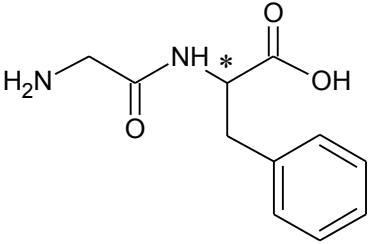
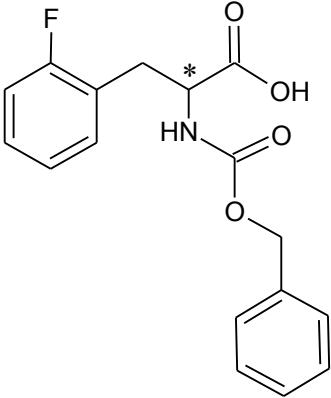
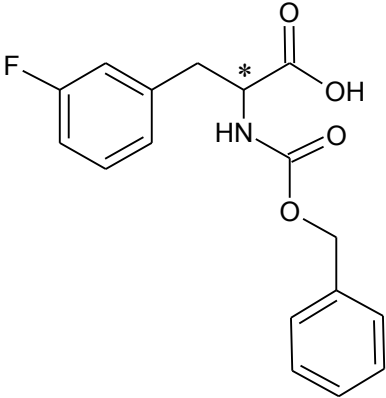
58. **Chankvetadze, B.; Endresz, G.; Blaschke, G.:** Enantiomeric resolution of chiral imidazole derivatives using capillary electrophoresis with cyclodextrin-type buffer modifiers. *Journal of Chromatography A* 700, 43 - 49 (1995).
59. **Smith, N. W.:** Separation of positional isomers and enantiomers using capillary zone electrophoresis with neutral and charged cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* 652, 259 - 262 (1993).
60. **Schmid, M. G.; Schreiner, K.; Reisinger, D.; Gübitz, G.:** Fast chiral separation by ligand-exchange HPLC using a dynamically coated monolithic column. *Journal of Separation Science* 29, 1470 - 1475 (2006).
61. **Gaš, B.; Jaroš, M.; Hruška, V.; Zuskova, I.; Štědrý, M.:** PeakMaster - A Freeware Simulator of Capillary Zone Electrophoresis. *LCGC Europe*, 282 - 288 (5/2005).

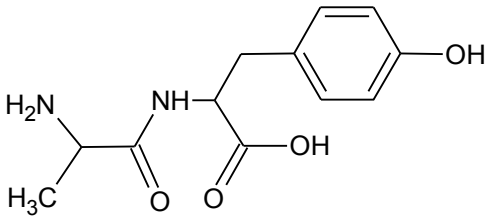
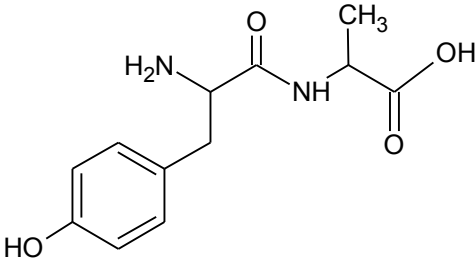
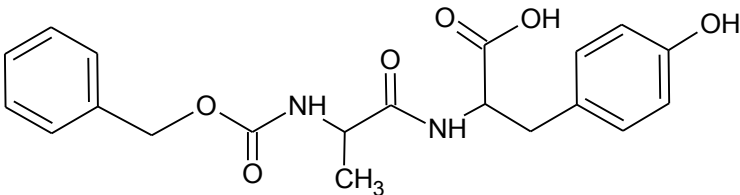
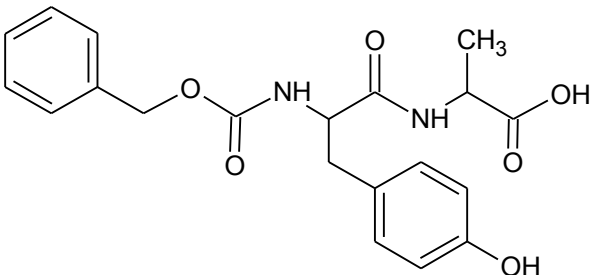
Příloha A

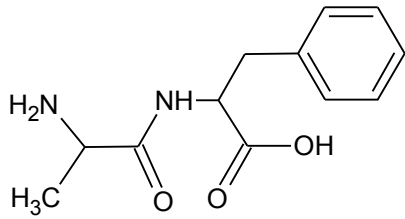
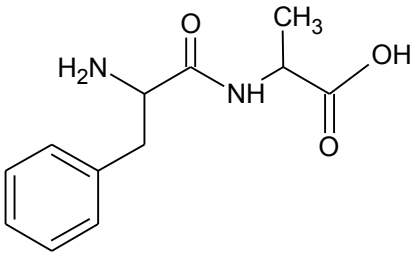
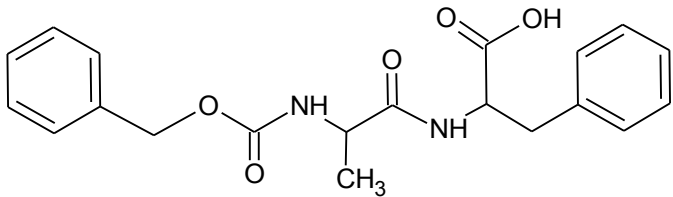
Název	Struktura
Chirální vzorky	
DL-Tyr	
α -methyl-DL-Tyr	
<i>t</i> -BOC-DL-Tyr	

Název	Struktura
DL-Trp	
Gly-DL-Trp	
<i>t</i> -BOC-DL-Trp	
DL-Phe	

Název	Struktura
<i>t</i> -BOC-DL-Phe	
DL-4-Cl-Phe	
<i>t</i> -BOC-4-Cl-DL-Phe	

Název	Struktura
Gly-DL-Phe	
Z-DL-2-F-Phe	
Z-DL-3-F-Phe	

Název	Struktura
Achirální vzorky	
H-Ala-Tyr-OH	
H-Tyr-Ala-OH	
Z-Ala-Tyr-OH	
Z-Tyr-Ala-OH	

Název	Struktura
H-Ala-Phe-OH	
H-Phe-Ala-OH	
Z-Ala-Phe-OH	
Z-Phe-Ala-OH	